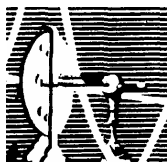


MARCOS ROMUALDO COSTA

“NOVOS PROGENITORES NA ZONA MARGINAL  
DO CÓRTEX CEREBRAL EM  
DESENVOLVIMENTO”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU  
DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2 0 0 6

COSTA, Marcos R.

Novos progenitores na zona marginal do córtex cerebral em desenvolvimento/ Marcos Romualdo Costa – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2006

ix, 153f.: il.

Orientador: Cecilia Hedin Pereira

Tese (Doutorado) – UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Programa de Formação em Pesquisa Médica

Referências Bibliográficas: f. 124-153

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 1. Córtex cerebral | 2. Progenitores    |
| 3. Zona marginal   | 4. Desenvolvimento |

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroanatomia Celular do Departamento de Anatomia da UFRJ, RJ - Brasil - e no Institute of Stem Cell Research do GSF, Munique - Alemanha - sob a orientação da Dra. Cecilia Hedin Pereira e colaboração da Dra. Magdalena Götz e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) e Deutsch Forschungsgemeinschaft (M.G.)

### **Agradecimentos:**

- À professora Cecilia Hedin Pereira, pela orientação científica e a amizade que fizeram a execução de todo este trabalho muito mais agradável;
- À professora Maira Monteiro Fróes, pela excelente e minuciosa revisão da tese, além de todas as demais contribuições dadas direta ou indiretamente a este trabalho;
- À professora Magdalena Götz, pela amigável recepção no seu laboratório e pelas agradáveis discussões científicas;
- Aos amigos, pelo apoio nas horas difíceis e pela vibração nos momentos de sucesso;
- Aos companheiros do Laboratório de Neuroanatomia Celular.

## Sumário

Lista de abreviaturas\_viii

Resumo\_ix

Abstract\_x

### I. Introdução\_1

1. Zonas germinativas envolvidas na formação do córtex cerebral\_3

1.1. A primeira população proliferativa do telencéfalo: progenitores da zona ventricular\_3

1.2. A segunda população proliferativa do telencéfalo: progenitores da zona subventricular\_5

2. Diferenciação celular no telencéfalo de roedores\_8

2.1. Progenitores neurais do córtex cerebral\_8

2.2. Genes envolvidos na especificação das células neurais\_22

2.3. Genes e ambiente\_26

3. Migração celular durante o desenvolvimento cortical\_32

3.1. Migração neuronal\_33

3.1.1. Migração radial\_33

3.1.2. Migração tangencial\_38

3.2. Migração de oligodendrócitos e astrócitos\_44

4. Composição celular da zona marginal ao longo da corticogênese\_45

### II. Objetivos\_52

### III. Materiais e métodos\_53

1. Animais\_53

2. Obtenção de cortes histológicos\_53

3. Incorporação de BrdU *in vivo*\_54

4. Cultura de células\_55

4.1. Infecção viral das culturas celulares\_56

5. Imunocitoquímica\_57

5.1. Anticorpos primários e secundários\_57

5.1.1. Tabela de anticorpos primários\_57

5.1.2. Tabela de anticorpos secundários\_58

5.2. Visualização dos núcleos celulares\_58

6. Análise clonal *in vitro*\_60

7. Análise quantitativa\_61

7.1. Número de células proliferativas *in vivo*\_61

7.2. Fenótipo das células proliferativas *in vivo*\_62

7.3. Células apoptóticas na zona marginal\_63

7.4. Células BrdU, Pax6 e Tbr2-positivas *in vitro*\_63

7.5. Incorporação do material genético viral por células proliferativas *in vitro*\_64

- 7.6. Frequência dos diferentes tipos de clones *in vitro*\_64
- 7.7. Número de células por clone\_65
- 7.8. Expressão de Relina por neurônios gerados *in vitro*\_66
- 7.9. Número de células proliferativas na zona marginal de camundongos *sey/sei in vivo*\_66

#### **IV. Resultados\_67**

- 1. Células na zona marginal apresentam capacidade proliferativa\_67
- 2. Progenitores na zona marginal não expressam Pax6 e Tbr2\_72
- 3. Olig2 é expresso por progenitores na zona marginal a partir de E16\_77
- 4. Progenitores na zona marginal proliferam *in vitro*\_81
- 5. Progenitores na zona marginal apresentam elevado potencial gliogênico *in vitro*\_87
- 6. Neurônios gerados por progenitores isolados da zona marginal não expressam Relina\_98
- 7. Camundongos *small eye* apresentam um aumento no número de progenitores na zona marginal\_100

#### **V. Discussão\_103**

- 1. Progenitores na zona marginal *in vivo*\_103
- 2. Especificação dos progenitores da zona marginal *in vivo*\_107
- 3. Potencial dos progenitores da zona marginal\_111
  - 3.1. Estudo das linhagens celulares *in vitro*\_114
- 4. Fenótipo dos neurônios gerados na zona marginal\_117
- 5. Efeito de mutações sobre a proliferação na zona marginal\_120
- 6. Conclusões finais\_121

#### **VI. Referências Bibliográficas\_122**

### Lista de abreviaturas

ZM -	Zona marginal
ZV -	Zona ventricular
ZSV -	Zona subventricular
ZI -	Zona intermediária
PC -	Placa cortical
EGL -	Eminência ganglionar lateral
EGM -	Eminência ganglionar medial
CGS -	Camada granular subpial
CR -	Cajal-Retzius
DIV -	Dias <i>in vitro</i>
BrdU -	5'-Bromo-2'-deoxiuridina
PH3 -	Fosfohistona 3
GFP -	<i>Green fluorescent protein</i>
Tc -	Duração do ciclo celular total
Ts -	Duração da fase S do ciclo celular
Tm -	Duração da fase M do ciclo celular

## Resumo

### NOVOS PROGENITORES NA ZONA MARGINAL DO CÓRTEX CEREBRAL EM DESENVOLVIMENTO

Ao longo do desenvolvimento, as células neuroepiteliais do telencéfalo dividem-se originando progenitores responsáveis pela geração sequencial dos diferentes tipos de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos do córtex cerebral. Até o presente, os progenitores telencefálicos estariam localizados nas zonas ventricular (ZV) e subventricular (ZSV). Sua posição ao longo dos eixos dorso-ventral e rostro-caudal é relacionada com territórios gênicos e tipos celulares específicos. Desta forma, observa-se a geração de neurônios corticais glutamatérgicos ou GABAérgicos na ZV e ZSV do telencéfalo dorsal e ventral de roedores, respectivamente. Neste trabalho investigamos o potencial proliferativo *in vivo* e *in vitro* da zona marginal (ZM), conhecida por possuir neurônios migratórios e diferenciados durante a corticogênese. Determinamos o fenótipo de células proliferativas da ZM e através de análise clonal utilizando infecção por retrovirus contendo o gene para GFP (proteína fluorescente verde) acompanhamos as linhagens derivadas destes progenitores *in vitro*. Células proliferativas *in vivo* foram marcadas através da administração do BrdU (bromodeoxiuridina, marcador da fase S do ciclo celular), combinada a ensaios imunohistoquímicos para a identificação deste antígeno e da forma fosforilada da histona 3 (expressa no final da fase G2 e durante a fase M do ciclo celular). Identificamos células proliferativas na ZM de camundongos a partir do dia embrionário 14 (E14 - logo após a divisão da pré-placa quando a ZM se torna distinguível) e por toda a corticogênese com um aumento na proporção de células proliferativas de ~três vezes em E18. As células proliferativas na ZM não expressam Pax6 ou Tbr2, fatores transcricionais característicos dos precursores da ZV e ZSV respectivamente. Ao longo da corticogênese, esta população precursora apresenta um padrão de expressão do fator transcricional Olig2 seguindo um gradiente látero-medial, de modo que no período perinatal todas as células proliferativas na zona marginal expressam o gene olig2. A análise das linhagens clonais geradas a partir destes precursores revelou um elevado potencial gliogênico (~70% de clones gliais puros) quando comparado a ZV /ZSV (3,3%). Além disso, a ZM apresentou um significativo potencial neurogênico, originando cerca de 30% de clones contendo neurônios. Mostramos que os clones gliais puros da ZM são significativamente maiores que os da ZV. Concluímos, portanto, que a ZM dorsal é um nicho neurogênico e gliogênico no córtex cerebral em desenvolvimento apresentando células proliferativas *in vivo* e *in vitro* com características fenotípicas distintas dos progenitores da ZV e ZSV. Através de estudos de linhagem clonal *in vitro*, demonstramos diferentes comportamentos proliferativos e potenciais neuro-gliogênicos das células isoladas da ZM e da ZV/ZSV, indicando a existência de um novo tipo de progenitor no telencéfalo.



## Abstract

### A NOVEL TYPE OF PROGENITOR IN THE DEVELOPING NEOCORTICAL MARGINAL ZONE

During development, telencephalic neuroepithelial cells proliferate and give rise to progenitors, which are responsible for the sequential generation of different types of neurons, astrocytes and oligodendrocytes in the cerebral cortex. To date, telencephalic progenitors would be located in the ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) zones. Their position along the rostro-caudal and dorso-ventral axis is related to gene expression territories and the generation of specific cell types, such that dorsal telencephalic VZ/ZVZ generates glutamatergic neurons and ventral VZ/ZVZ GABAergic neurons. In this work we investigated the *in vivo* and *in vitro* proliferative potential of the marginal zone (MZ) described to harbor migrating and differentiating neurons during corticogenesis. We determined the phenotype of MZ proliferative cells and by clonal analysis with infection by GFP (green fluorescent protein) containing retroviruses we followed the lineages derived from the progenitors *in vitro*. Proliferative cells *in vivo* were labeled by BrdU (bromodeoxyuridine, S phase cell cycle marker) combined to immunohistochemistry for the identification of BrdU antigen and the phosphorylated form of H3 –histone (expressed at the end of G2 and during M phase of the cell cycle). We identified proliferative cells in mice MZ from embryonic day (E)14 (just after preplate division when MZ becomes distinguishable) and through all corticogenesis with a three fold increase in E18. Proliferative cells in the MZ do not express Pax6 or Tbr2, transcriptional factors typical of VZ and SVZ precursors respectively. During corticogenesis, this precursor population displays a latero-medial gradient of expression of Olig2, such that perinatally, all proliferative cells in the MZ express Olig2. Clonal lineage analysis from these precursors revealed a high gliogenic potential (~70% pure glial clones) when compared to VZ/SVZ (2,3%). Furthermore, MZ displays neurogenic potential since 30% of all clones contained neurons identified by class III  $\beta$ -tubulin immunolabeling. Here we show that pure glial clones in the MZ are significantly larger than those generated by VZ. Concluding, the dorsal MZ is a neurogenic and gliogenic niche in the developing cerebral cortex containing proliferative cells with distinct phenotypic characteristics from the VZ and SVZ. By clonal lineage analysis *in vitro*, we demonstrated different proliferative behaviors and neuro-gliogenic potential from cells isolated from the MZ and VZ/SVZ indicating a novel type of progenitor in the cerebral cortex.

## **I. Introdução**

A formação do córtex cerebral depende da geração e posicionamento adequados de diferentes tipos de neurônios e células macrogliais (astrócitos e oligodendrócitos).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células neuroepiteliais que formam a parede do tubo neural apresentam uma intensa atividade proliferativa, responsável pelo crescimento longitudinal e transversal deste tubo. Estas células também são responsáveis pela geração dos progenitores que compõem a zona ventricular (Boulder Committee, 1970) e, subsequentemente, a zona subventricular telencefálicas (Boulder Committee, 1970; Smart, 1972; Takahashi et al., 1993; 1995; Noctor et al., 2004).

A zona ventricular e subventricular do telencéfalo dorsal de roedores são consideradas as principais fontes de neurônios de projeção corticais (Parnavelas, 2000), enquanto os neurônios não-piramidais GABAérgicos parecem ser gerados quase exclusivamente no telencéfalo ventral (Marin & Rubenstein, 2001).

Enquanto o número de progenitores na zona ventricular é progressivamente reduzido durante a corticogênese, uma população proliferativa secundária cresce na zona subventricular (Takahashi et al., 1995). No final do período embrionário e durante as primeiras semanas pós-natais, esta população apresenta um elevado potencial gliogênico sendo responsável pela geração de um grande número de astrócitos e oligodendrócitos corticais, além de

interneurônios do bulbo olfatório (Marshall et al., 2003). A transformação das células de glia radial em astrócitos (Voigt et al., 1989; Takahashi et al., 1992; Alves et al., 2001) e a migração de precursores de oligodendrócitos a partir do telencéfalo ventral (Tekki-Kessaris et al., 2001; Nery et al., 2001), completam a população de células macrogliais do córtex cerebral de roedores.

Neste trabalho, descrevemos uma terceira população de progenitores no córtex cerebral, presentes na zona marginal do telencéfalo dorsal, de momentos intermediários da corticogênese até, pelo menos, o fim do período embrionário de camundongos. Estudos de linhagem celular (análises clonais) a partir das células da zona marginal ou das zonas ventricular e subventricular confirmam a existência deste novo progenitor no desenvolvimento cortical.

## **1. Zonas germinativas envolvidas na formação do córtex cerebral**

Em momentos precoces da corticogênese, a zona ventricular telencefálica é formada por células neuroepiteliais, caracterizadas pela presença de um prolongamento radial em contato com a superfície pial e outro contactando a luz do tubo neural. Dentro deste neuroepitélio, as células apresentam um movimento de migração nuclear intercinético, associado à fase do ciclo celular em que os progenitores se encontram, de modo que os núcleos celulares apresentam uma localização abventricular durante a fase S (duplicação do DNA) e tangenciam a luz ventricular durante a fase M (divisão celular) (Sauer, 1935).

Com o surgimento dos primeiros neurônios pós-mitóticos na pré-placa (Boulder Committee, 1970) e as sucessivas ondas de neurônios para a placa cortical (Boulder Committee, 1970), alguns progenitores na zona ventricular mantêm longas fibras radiais em contato com a superfície pial, enquanto outras células apresentam prolongamentos curtos, interrompidos na zona subventricular ou intermediária (Gal et al., 2006).

### **1.1. A primeira população proliferativa: progenitores da zona ventricular**

As células na zona ventricular que apresentam um longo processo radial contactando a zona marginal, logo abaixo à superfície pial, foram denominadas células de glia radial (revisto por Rakic, 1995). Inicialmente, estas células foram

associadas à migração radial dos neurônios pós-mitóticos, em que apresentariam um papel de suporte (Rakic, 1971). Entretanto, evidências recentes demonstraram o papel destas células na geração de neurônios corticais em roedores (Malatesta et al., 2000; Tamamaki et al., 2001; Noctor et al., 2002; 2004; Malatesta et al., 2003; Miyata et al., 2002).

Embora os dados experimentais sejam claros na demonstração de neurogênese a partir da glia radial, não é bem definido de que maneira estas células são geradas a partir do amadurecimento de células neuroepiteliais (Tramontin et al., 2003) ou se representam uma população distinta na zona ventricular, em contraste com os progenitores com “prolongamentos curtos” (Gal et al., 2006). Além disso, não existem dados que sustentem a idéia de que todas as células de glia radial no telencéfalo proliferem e ainda não está claro o papel destas células na geração de neurônios no telencéfalo ventral (Malatesta et al., 2003; Anthony et al. 2004; Götz & Huttner, 2005).

Os diferentes critérios utilizados para se definir uma célula de glia radial tornam confusa a análise dos resultados experimentais. Como já discutido anteriormente, a definição morfológica destas células foi a primeira utilizada na literatura (Rakic 1971; 1972) e deveria servir como padrão nos estudos subsequentes. Na prática, os principais estudos demonstrando a contribuição desta população na neurogênese *in situ* utilizam estratégias genéticas em que determinados promotores, como o da proteína glial fibrilar ácida de humanos - hGFAP (Malatesta et al., 2003) - ou da BLBP (“brain lipid binding protein” Anthony et al., 2004), controlam a expressão da proteína Cre-recombinase,

permitindo a deleção de um códon de parada situado a jusante de um gene repórter, que passa a ser expresso nas células descendentes. No entanto, não está claro se as células que expressam hGFAP ou BLBP no telencéfalo embrionário são as células de glia radial *in situ*.

Independentemente das nomenclaturas, podemos dizer que: 1) Uma população de células que expressa o hGFAP gera, predominantemente, neurônios corticais de projeção, contribuindo modestamente para a população de interneurônios corticais ou neurônios dos núcleos da base (Malatesta et al., 2003); 2) Os progenitores que expressam BLBP apresentam um potencial mais amplo, gerando diferentes tipos neuronais no córtex e núcleos da base (Anthony et al., 2004); 3) Em ambos os estudos citados, os progenitores estudados também contribuem para o desenvolvimento das células macrogliais; e 4) Existe um grande número de progenitores na zona ventricular que não apresentam características de glia radial (Gal et al., 2006) e podem estar regulando diferentemente o hGFAP ou BLBP.

## **1.2. A segunda população proliferativa do telencéfalo: progenitores da zona subventricular**

Em períodos intermediários da corticogênese, uma segunda população proliferativa surge no telencéfalo e ocupa a zona subventricular e intermediária (Boulder Committee, 1970; Takahashi et al., 1995). Esta população aumenta significativamente em número ao longo da corticogênese, enquanto a zona

ventricular se torna cada vez mais reduzida (Takahashi et al., 1995), e está associada com a geração de neurônios corticais durante o período embrionário em roedores (Noctor et al., 2004; Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004) e primatas (Smart et al., 2002; Zecevic et al., 2005).

Em contraste com os progenitores da zona ventricular, os da zona subventricular não apresentam migração nuclear intercinética, duplicando os seus materiais genéticos e se dividindo em posições basais aos primeiros (Takahashi et al., 1995; Noctor et al., 2004; Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004).

No fim do período embrionário e durante as primeiras semanas pós-natais de roedores, os progenitores da zona subventricular mantêm uma elevada atividade proliferativa, contribuindo para a geração de um grande número de astrócitos e oligodendrócitos corticais (Levison & Goldman, 1993; 1997; Marshall et al., 2003), além de apresentarem um potencial neurogênico que mantém-se na vida adulta, responsável pela geração de interneurônios para o bulbo olfatório (Luskin, 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996).

Portanto, poderíamos dizer que as células neuroepiteliais ao longo do desenvolvimento originam os progenitores da zona ventricular e subventricular, sendo que os primeiros mantêm contato com a luz ventricular e, em alguns

casos, com a superfície pial, enquanto os segundos perdem ambos os contatos<sup>1</sup>.

Devido à sobreposição temporal das populações de progenitores na ZV e ZSV durante o desenvolvimento e as dificuldades técnicas na separação destas regiões, ainda não está claro como cada uma destas populações contribui para a geração dos diferentes tipos celulares do córtex cerebral. Além disso, não podemos excluir a possibilidade de que dentro de uma mesma camada germinativa existam progenitores com diferentes potenciais, dependendo das suas posições nos eixos dorso-ventral e látero-medial (Panchision & McKay, 2002), idade embrionária (Frantz & McConnell, 1996), número de ciclos celulares (Takahashi et al., 1999) ou expressão gênica (Götz & Huttner, 2005).

O potencial dos progenitores telencefálicos para gerar diferentes tipos de células neuronais e macrogliais durante o desenvolvimento foi estudado através de diversas técnicas experimentais (Luskin et al., 1988; Temple, 1989; Williams & Price, 1995), como será discutido adiante. No entanto, estes estudos não levavam em consideração a existência de progenitores intermediários na zona subventricular, pois consideravam que a única zona germinativa no telencéfalo era a zona ventricular.

No próximo capítulo, discutiremos alguns dos resultados descritos por diferentes pesquisadores que estudaram o potencial dos progenitores telencefálicos isolados de diferentes regiões *in situ* e *in vitro*.

---

<sup>1</sup> Embora os progenitores na zona subventricular embrionária não apresentem contacto com a luz do ventrículo lateral, durante a vida adulta os progenitores da zona subventricular (células B) apresentam um prolongamento ciliar que contacta a luz ventricular (Doetsch et al., 1999).



## **2. Diferenciação celular no telencéfalo de roedores:**

### **2.1. Progenitores neurais do córtex cerebral:**

O córtex cerebral adulto apresenta diferentes tipos neuronais, com diferentes morfologias e propriedades químicas e eletrofisiológicas. Além destes, temos astrócitos e oligodendrócitos, microglia e vasos sanguíneos, supostamente subdivididos em tipos morfofuncionais especializados também. Com exceção dos vasos e da microglia essa enorme diversidade celular tem sua origem no epitélio pseudo-estratificado do tubo neural.

Poderia se perguntar de que maneira uma célula individual da zona ventricular telencefálica possui a capacidade de gerar os três principais tipos de células neurais (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos) e, subsequentemente, subtipos neuronais, astrocitários ou oligodendrocitários. Para tentar responder esta pergunta, inúmeros pesquisadores estabeleceram protocolos para estudar a linhagem de uma única célula precursora *in vitro* e *in situ*.

O estudo de linhagens celulares no córtex de roedores *in situ* depende do uso de um marcador que possa ser incorporado por uma célula progenitora e, subsequentemente, transmitido para a sua progênie. O uso de vetores retrovirais preenche os requisitos acima, pois os seus materiais genéticos, devido à ausência da proteína transportase, só podem ser incorporados aos núcleos de células mitóticas. Em geral, são utilizados como repórteres, genes que codificam proteínas identificáveis por métodos imunohistoquímicos, como  $\beta$ -galactosidase,

fosfatase alcalina ou GFP (“green fluorescent protein”), permitindo a reconstituição de uma linhagem derivada a partir de uma célula progenitora.

Em 1988, Marla Luskin (Luskin et al., 1988) publicou suas observações, a partir da infecção de progenitores telencefálicos isolados com retrovírus (BAG), em camundongos (E12-E14). A análise das células que incorporavam o gene repórter ( $\beta$ -galactosidase) foi feita entre a primeira e terceira semana pós-natal e a definição de clone foi baseada na relação espacial entre as células que apresentavam  $\beta$ -galactosidase. Basicamente, os autores consideravam como pertencentes a um mesmo clone, células que estavam separadas por uma curta distância ou se apresentavam radialmente dispostas. Através da morfologia das células encontradas, os autores concluíram que, em sua maioria, os clones eram formados por um único tipo celular, sendo que os clones mais frequentes eram neuronais, organizados em colunas radiais ao longo do córtex.

O critério espacial utilizado para a definição de um clone é passível de críticas, pois se considerarmos que uma única célula infectada origina neurônios por dois ou três ciclos celulares e, finalmente, origina astrócitos ou oligodendrócitos (Qian et al., 1999), o simples crescimento tangencial do córtex ao longo do desenvolvimento posicionaria estas células a grandes distâncias. Pela definição espacial de clone, estas células seriam consideradas de clones distintos, apesar de não o serem. Além disso, teríamos que levar em conta os movimentos migratórios dos progenitores e das células geradas como um fator de mistura de clones múltiplos (Fishell, 1993; O’Rourke et al., 1992; Marín & Rubenstein, 2001). Os efeitos destas variáveis podem ser identificados quando

os autores, por exemplo, definem clones com apenas um neurônio como “neuronal puro” (Luskin et al., 1988; Grove et al., 1993).

De fato, Walsh e Cepko publicaram alguns resultados contraditórios com os estudos de Luskin e colaboradores (1988), utilizando a mesma técnica de infecção de progenitores telencefálicos em ratos (Walsh & Cepko, 1988). Neste estudo, o comportamento das células marcadas foi avaliado após curtos intervalos de tempo entre a infecção e o sacrifício (3 a 7 dias), revelando algumas células em orientação perpendicular às fibras de glia radial, principalmente, na zona intermediária e ventricular. Este resultado foi interpretado como um fator de dispersão entre células derivadas de um mesmo progenitor, motivo pelo qual os autores não teriam utilizado o critério espacial para definir um clone. Desta forma, contrariando as conclusões de Luskin e colaboradores (1988), os autores sugerem que a maioria dos clones neuronais não estaria organizada em colunas. Por outro lado, nos casos em que as células apresentam uma organização estritamente radial, os clones seriam formados por células gliais. Apesar destes autores não entrarem no mérito da homogeneidade dos clones, o critério da utilização das distâncias entre células relacionadas para definição de um caráter clonal mostrou-se limitado, uma vez que pode haver uma significativa dispersão entre elas no plano tangencial (Fishell, 1993; O’Rourke et al., 1992; Marín & Rubenstein, 2001), o que colocaria em cheque a interpretação de que os clones seriam formados por um único tipo celular (Luskin et al., 1988)

Também contradizendo os achados de Luskin e colaboradores, outros autores desafiaram a disposição colunar de clones neuronais e sua limitação na diversidade celular de sua progênie (Price & Thurlow, 1988). Assim, clones mistos de neurônios e “células horizontais” (células pequenas e com processos horizontais paralelos aos axônios da substância branca), além de um clone, possivelmente, contendo astrócitos, neurônios e células horizontais foram relatados por estes autores.

Elizabeth Grove e colaboradores, em ensaios que combinavam, pioneiramente, a infecção com retrovírus com técnicas imunohistoquímicas, descreveram um grande número de clones contendo apenas neurônios ou células macrogliais (Grove et al., 1993). No entanto, os autores descrevem um grande número de “clones neuronais puros” formados por um único neurônio. Para aceitar esta interpretação precisaríamos admitir que um progenitor infectado no meio do período neurogênico no córtex dividiu-se uma única vez (sendo que a segunda célula morreu) ou que todas as outras células relacionadas a este “clone” morreram.

Desta forma, a pergunta inicial: “as células progenitoras no telencéfalo são multipotenciais ou existem diferentes populações de progenitores para os diversos tipos e subtipos neurais?” permanecia sem uma resposta definitiva.

Marla Luskin atribuiu a divergência entre seus resultados e os de outros grupos a dificuldades técnicas com o uso da reação da  $\beta$ -galactosidase e a identificação celular por critérios morfológicos com o microscópio óptico. Novas análises clonais foram então feitas no córtex de ratos pós-natais e adultos após

injeção de retrovírus em E15-16 (Luskin et al., 1993). Os clones foram novamente definidos por critérios espaciais (distância entre as células  $\leq 500\mu\text{m}$ ) e o fenótipo das células pertencentes a um mesmo clone foi estabelecido por técnicas ultra-morfológicas. Com esta abordagem, os autores sugerem a existência de precursores restritos durante a embriogênese, uma vez que a maioria dos clones apresentou um único tipo celular: neurônio, astrócito ou oligodendrócito.

Neste último e em outros trabalhos, os clones neuronais apresentaram homogeneidade em termos morfológicos, de modo que neurônios piramidais pertencem a clones diferentes daqueles contendo neurônios não-piramidais (Parnavelas et al., 1991; Luskin et al., 1993; Mione et al., 1994).

Conforme citado anteriormente, a dispersão celular tangencial durante o desenvolvimento, produzida por migração celular (Fishell, 1993; O'Rourke et al., 1992; Marín & Rubenstein, 2001) aliada ou não ao crescimento horizontal do córtex, eram fontes potenciais de erros de interpretação do caráter clonal se assumidos unicamente critérios de distribuição espacial. Uma técnica mais direta para relacionar a progênie de um único precursor fazia-se necessária. O desenvolvimento de retrovírus contendo fragmentos de DNA com diferentes "tags" ("biblioteca retroviral") mostrou-se uma valiosa ferramenta no estudo das linhagens clonais, pois permitia que a relação clonal entre células fosse avaliada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), independente da sua dispersão espacial (Walsh & Cepko, 1992; 1993). Com esta técnica, os autores confirmaram seus achados anteriores (Walsh & Cepko, 1988) e mostraram que

existe uma grande dispersão celular nas camadas proliferativas do córtex embrionário. Em adição, foi possível calcular, estatisticamente, a probabilidade de incluir em um mesmo clone células derivadas de precursores diferentes ou de não considerar células de um mesmo clone quando do uso da definição geométrica de clone (Walsh & Cepko, 1992).

Utilizando esta biblioteca de retrovirus em ratos E14, foi mostrado que as células pertencentes a um mesmo “cluster”, isto é, posicionadas a curtas distâncias umas das outras, eram do mesmo tipo, baseado em critérios morfológicos (Reid et al., 1995). Este achado está de acordo com os “clones” relatados anteriormente (definição baseada em proximidade, Luskin et al., 1988; Parnavelas, 1991; Luskin et al., 1993; Mione et al., 1994), mas neste caso representam apenas 52% dos clones definidos como tal por apresentarem todas as células com o mesmo marcador (*tag*). Os demais clones eram formados por células posicionadas a grandes distâncias umas das outras, podendo conter dois ou mais “clusters” celulares definidos anatomicamente, como havia sido sugerido por Walsh & Cepko. Vale ressaltar que estes clones apresentavam misturas de neurônios e glia (2/18), sendo que quase metade dos clones (8/18) apresentava neurônios piramidais e não-piramidais, sugerindo que um mesmo progenitor poderia originar estes dois tipos neuronais ou mesmo neurônios e glia. Injeções feitas em E17 revelaram uma diminuição do número de clones mistos (12,5%), sendo que a maioria dos clones era exclusivamente glial ou formada por apenas dois neurônios.

Os resultados descritos acima, sugerindo a existência de progenitores comprometidos com a geração de determinada linhagem celular (neuronal x glial; neurônio piramidal x não-piramidal; astrócito x oligodendrócito) no telencéfalo embrionário, foram obtidos com injeção de retrovírus no meio do período neurogênico, de modo que o potencial dos progenitores presentes na zona ventricular em períodos mais precoces da corticogênese permanecia inexplorada. Com o desenvolvimento de bibliotecas retrovirais mais resistentes ao “silenciamento” (diminuição da expressão do gene repórter por células relacionadas clonalmente) e de técnicas permitindo a injeção de retrovírus para a luz do tubo neural (Gaiano et al., 1999), foi possível estudar o potencial dos progenitores presentes no início da corticogênese.

Através da injeção de retrovírus para a luz do tubo neural de camundongos em E9,5 e análise clonal após a terceira semana pós-natal (McCarthy et al., 2001), foram descritos clones neuronais puros (34,4%), gliais puros (46,9%) e mistos (18,8%), sugerindo a existência de progenitores restritos a determinadas linhagens celulares logo após o fechamento do tubo neural. No entanto, os clones “gliais puros” foram observados, predominantemente, no telencéfalo ventral e apresentavam relações espaciais com células neuronais, cuja amplificação e análise por PCR falharam (McCarthy et al., 2001), de modo que não podemos excluir a possibilidade de tratar-se de clones mistos.

Neste mesmo trabalho, foram descritos os clones que, em alguns casos, apresentavam neurônios piramidais e não-piramidais, mas como a frequência

destes clones foi muito baixa, os autores consideraram uma exceção a existência de um mesmo progenitor em E9,5 para estes dois tipos celulares.

Por outro lado, a análise clonal de progenitores marcados em E14 revelou a existência de um grande número de clones contendo ambos, neurônios piramidais e não piramidais (44%), assim como clones contendo interneurônios corticais e neurônios estriatais (16%) ou astrócitos (20%) em ratos (Reid & Walsh 2002).

Do conjunto de dados descritos anteriormente, podemos concluir que o potencial dos progenitores presentes no telencéfalo embrionário permanece indeterminado. Tanto a definição de clones por critérios espaciais quanto o uso de marcadores moleculares identificáveis por PCR são passíveis de crítica. O primeiro, pelo alto grau de migração celular durante o desenvolvimento e o crescimento horizontal do córtex; e o segundo, pela baixa sensibilidade dos PCRs (apenas 40% das células têm o gene repórter devidamente amplificado e sequenciado).

Essas dificuldades técnicas e outras variações metodológicas entre os diferentes trabalhos, como as idades de infecção, tornam a interpretação dos resultados extremamente difícil. Poderíamos extrair, no entanto, alguns pontos comuns: 1) “Clusters” neuronais são compostos por um baixo número de células, sugerindo que os progenitores neuronais apresentam um número limitado de divisões celulares; 2) Mesmo com a baixa sensibilidade dos PCRs, são descritos neurônios piramidais e não-piramidais, assim como neurônios e astrócitos, derivados de um mesmo progenitor em experimentos independentes;



3) a maioria das evidências de populações de progenitores com potencial fenotípico restrito está baseada na definição espacial de clone.

A seguir, discutiremos alguns dos resultados de culturas celulares obtidos por diferentes pesquisadores no estudo das linhagens clonais de progenitores derivados do telencéfalo dorsal em diferentes períodos do desenvolvimento. Vale ressaltar que estes estudos incluem os progenitores da zona ventricular como aqueles presentes em outra(s) região(s) germinativa(s), ao contrário do que ocorreria *in situ*, em que apenas os progenitores em contato com a luz ventricular seriam infectados.

Cultivando células individuais isoladas da região septal do córtex cerebral de ratos E13,5-14,5 (Temple, 1989), foi observado que a maioria destas células (70%) geravam clones neuronais, sendo que a maioria destes clones continham apenas dois neurônios. As demais células geravam clones não-neuronais (8%) ou clones mistos (22%), contendo neurônios e astrócitos imunorreativos para GFAP em 50% dos clones. Não foram observados oligodendrócitos nas condições utilizadas, tanto em clones puros quanto mistos. A partir destes resultados, a autora sugere a existência de um progenitor multipotente, capaz de gerar clones mistos e com grande número de células, e progenitores unipotentes (possivelmente, gerados a partir dos multipotentes), apresentando limitada capacidade proliferativa e restrição fenotípica.

Utilizando um sistema de cultivo bastante similar, Andrew Davis analisou a composição de clones gerados por células isoladas do córtex cerebral de ratos em E12 e E14 (Davis & Temple, 1994). Em ambas as idades, foram observados

clones neuronais puros (~80%); oligo ou astrocitários puros (3-4%) e mistos (~9%). Os clones mistos continham, em 40% dos casos, os três tipos celulares descritos, sugerindo a existência de um progenitor tripotente no córtex cerebral. Os autores também descrevem “clones de células-tronco”, os quais foram subclonados e apresentaram células com as mesmas características descritas acima, sugerindo que a célula fundadora do clone é capaz de auto-renovação.

Devemos ter em mente duas diferenças metodológicas significativas entre estes dois últimos trabalhos: 1) a fonte das células precursoras (septo x parede latero-dorsal do telencéfalo dorsal) e 2) o meio de cultura utilizado (com soro fetal bovino (Temple, 1989) ou sem soro fetal bovino (Davis & Temple, 1994). Embora seja difícil especular sobre os efeitos da primeira variável, pois teríamos que assumir heterogeneidades entre as diferentes populações celulares no eixo látero-medial capazes de alterar seus potenciais, podemos ter uma idéia bastante clara de como a alteração das condições de cultivo podem alterar a composição dos clones gerados pelos progenitores telencefálicos.

Cultivando células derivadas do córtex de ratos entre E12 e E18 sobre monocamadas astrocitárias, foram avaliados os efeitos da adição de soro na composição dos clones (Williams & Price, 1995). Notoriamente, quando as células foram cultivadas na ausência de soro, houve um aumento de 4 para 51% na frequência de clones formados apenas por oligodendrócitos, com a concomitante redução dos clones astrocitários puros (69 para 2%). Em seguida, estes autores também avaliaram a composição dos clones cultivados diretamente em Poli-D-lisina ou sobre as monocamadas, onde foi observado: 1)

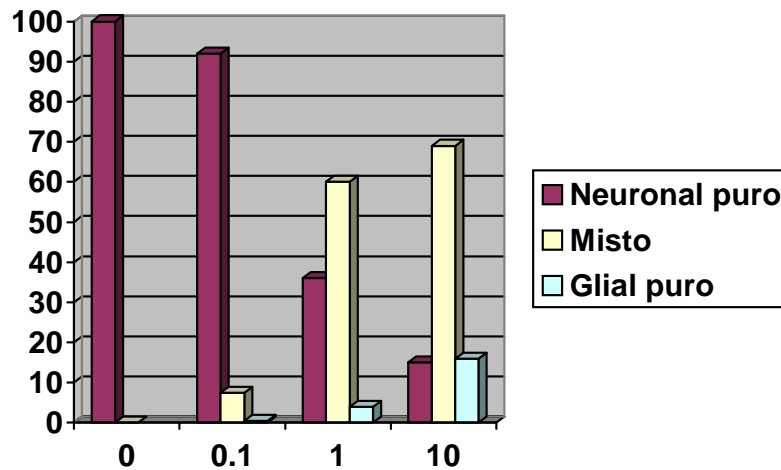
uma redução significativa na frequência de clones oligodendrocitários (40 para 3%); 2) aparecimento de clones astrocitários (5%) e 3) desaparecimento dos clones mistos contendo oligos e neurônios, com aparecimento de clones contendo neurônios e astrócitos (4%).

A obtenção de diferentes tipos de clones por estes diferentes grupos, apesar de todas as diferenças metodológicas e, conseqüentemente, variações nas composições destes clones, sugere a coexistência de progenitores multipotentes e unipotentes no telencéfalo dorsal. No entanto, não podemos determinar se estas células estão presentes exclusivamente na zona ventricular, indicando uma heterogeneidade dentro desta zona germinativa, ou representam amostragens de células derivadas da zona ventricular e subventricular.

As alterações na composição dos clones descrita por Williams & Price (1995) sugere que o potencial dos progenitores telencefálicos pode ser alterado por fatores externos, mas não determina de que maneira esse fenômeno ocorre através da reespecificação de células individuais ou se é um efeito populacional, produzido, por exemplo, através da seleção de determinados progenitores.

Utilizando o sistema de cultivo de células individualizadas descrita por Sally Temple (1989), foi estudado o efeito da adição de FGF2 em culturas de progenitores corticais de camundongos E10 (Qian et al., 1997). Em primeiro lugar, os autores descrevem um efeito mitogênico exponencial deste fator de crescimento, medido pela incorporação de BrdU (um análogo da timidina incorporado pelas células na fase S do ciclo celular) pelas células em cultivo. Em seguida, a composição dos clones gerados por células expostas a diferentes

concentrações de FGF2 foi avaliada e o resultado está resumido no gráfico abaixo, onde estão representadas as frequências de clones em função da concentração de FGF em ng/ml:



Retirado de Qian et al., 1997.

Como podemos perceber, a adição de FGF2 aumenta significativamente a frequência de clones gliais e mistos de maneira dose dependente. Este mesmo efeito foi observado quando as células eram mantidas 24h em 0.1ng/ml de FGF2 e, em seguida, cultivadas em 0.1, 1 ou 10ng/ml, sugerindo que este efeito não é dependente da seleção de clones gliais. Por fim, os autores observaram que a adição de FGF2 não alterava o número total de células nos clones neuronais (que variam de 1 a 128 células!) e que as células gliais observadas eram, em 98% dos casos oligodendrócitos (O4+). Por outro lado, a adição de meio condicionado de astrócitos e células meníngeas permitiu a observação de astrócitos GFAP+ em mais de 90% dos clones gliais e mistos.

É importante ressaltar que no sistema de cultivo utilizado por estes autores apenas 1% das células proliferam nas primeiras 24h sem adição de FGF2. Quando este fator foi adicionado às culturas, nas diferentes concentrações descritas, o número de células que incorporaram BrdU no primeiro dia de cultivo aumentou para 8-10%. Isto significa que apenas uma fração de células progenitoras mantém suas propriedades proliferativas quando cultivadas isoladamente *in vitro*, visto que a ZV telencefálica em camundongos E10 é composta, quase exclusivamente, por células capazes de proliferar. De qualquer maneira, a demonstração de que esta fração de progenitores pode ter seu potencial alterado por diferentes concentrações de FGF2 sugere que a geração de neurônios e glia durante o desenvolvimento pode ser controlada por fatores ambientais e que estas mesmas moléculas podem interferir com o ciclo celular das células progenitoras, mas depende da assumpção de que os 10% de células que proliferam na presença de 0,1 ou 1 ng/ml de FGF2 são os mesmos.

Por outro lado, a existência de células progenitoras capazes de gerar clones neuronais de diferentes tamanhos (1 a 128 células) ou clones mistos em culturas de células isoladas sugere a existência de diferentes populações de progenitores no momento da dissociação. De acordo com esta interpretação, foi mostrado, através de vídeo-microscopia, que uma mesma célula progenitora é capaz de dividir-se assimetricamente gerando um neurônio e outra célula progenitora, a qual pode realizar outra divisão assimétrica, gerando outro neurônio e um progenitor, ou dividir-se simetricamente, gerando dois neurônios (Qian et al., 1998).

Em alguns casos, principalmente a partir de células derivadas do córtex E13, foram observados clones onde havia um predomínio de divisões simétricas, gerando um grande número de células com características gliais (Qian et al., 1998). Com base nestes resultados, os autores sugeriram a existência de dois tipos de progenitores distintos: 1) neuroblastos restritos, que se dividem assimetricamente gerando neurônios e outros neuroblastos, até a “divisão simétrica final” e 2) glioblastos restritos, apresentando um grande número de divisões simétricas, responsável pela amplificação da população de progenitores gliais.

Por fim, utilizando este mesmo sistema, os autores avaliaram o desenvolvimento de clones mistos e observaram que, ao longo do período de observação, existia uma hierarquia na geração de neurônios e células gliais (Qian et al., 2000). Resumidamente, foi descrito que, a partir de um progenitor multipotente, eram gerados neuroblastos que apresentam um padrão de divisão celular similar aos clones descritos previamente (Qian et al., 1998). Em momentos mais tardios, observava-se o surgimento de glioblastos que sofriam uma série de divisões simétricas.

De maneira resumida, poderíamos dizer que os diferentes resultados discutidos acima sugerem a existência de progenitores multipotentes (capazes de originar neurônios e células macrogliais) e progenitores restritos (potencial de gerar apenas neurônios ou células macrogliais) no córtex embrionário. No entanto, não é possível determinarmos, por exemplo, de que maneira estas

células pertencem a uma mesma zona germinativa ou seriam segregadas espacialmente na zona ventricular e subventricular do telencéfalo dorsal.

Para responder a esta pergunta, serão necessárias metodologias capazes de analisar as linhagens celulares derivadas de progenitores presentes em diferentes regiões germinativas separadamente. Uma possibilidade, seria a utilização de marcadores genéticos específicos para determinada zona germinativa, permitindo a separação de células específicas para esta área

Nos últimos anos, tem sido descrita a expressão de diferentes fatores de transcrição por progenitores telencefálicos que poderiam servir a este propósito. A seguir, alguns destes genes serão apresentados, assim como seus possíveis papéis na determinação do fenótipo neural.

## **2.2. Genes envolvidos na especificação das células neurais:**

Durante o desenvolvimento, o telencéfalo de roedores é dividido em domínios caracterizados pela expressão de diferentes genes. Além de uma série de evidências demonstrando o envolvimento destes genes na especificação da identidade do território telencefálico em que são expressos (Schuurmans & Guillemot, 2002), alguns dos fatores de transcrição codificados por estes genes também parecem exercer um papel na determinação do potencial neurogênico *versus* potencial gliogênico dos progenitores (Bertrand et al., 2002).

Os neurônios piramidais do córtex cerebral, por exemplo, são gerados a partir de progenitores na zona ventricular do telencéfalo dorsal, que expressam

os fatores de transcrição Ngn1, Ngn2, Pax6, Emx1 e Emx2 (Schuurmans & Guillemot, 2002).

Ngn1 e Ngn2 pertencem a família das proteínas bHLH (“basic Helix-Loop-Helix”) e estão envolvidas na especificação de neurônios corticais glutamatérgicos (Schuurmans et al., 2004). Além disso, a Ngn2 apresenta um papel na migração radial dos neurônios gerados no telencéfalo dorsal e coordena a aquisição da morfologia dendrítica característica dos neurônios piramidais, através de um mecanismo molecular distinto daquele envolvido no seu papel proneuronal (Hand et al., 2005).

Por sua vez, a proteína Pax6 (“homeodomain protein”) tem sido associada com a geração de neurônios a partir das células de glia radial (Heins et al., 2002), caracterizadas pela expressão da hGFAP (Malatesta et al., 2000). Além disso, a expressão deste fator transcricional em culturas de córtex embrionário aumenta a frequência de clones neuronais (Haubst et al., 2004), enquanto a sua expressão em monocamadas astrocitárias ou neurosféricas adultas induz a geração de neurônios (B. Berninger e M. Götz, comunicação pessoal).

Outros genes como *emx1* e *emx2* são expressos por progenitores da zona ventricular do telencéfalo dorsal e podem estar envolvidos na especificação das células geradas nesta região. No entanto, os dados experimentais até a presente data apenas indicam um papel destes genes na determinação de áreas corticais (Yoshida et al., 1997; Mallamaci et al., 2000), sem analisar seu efeito pro-neuronal ou glial.



Da mesma forma, o gene do fator transcricional Tbr2 é expresso pelas células da zona subventricular do telencéfalo dorsal e tem sido associado ao potencial neurogênico dos progenitores presentes nesta região (Englund et al., 2005). Segundo estes autores, os progenitores expressando *pax6* na zona ventricular dorsal gerariam os progenitores intermediários (Tbr2-positivos) da zona subventricular e, por fim, neurônios pós-mitóticos que expressariam *tbr1*. Porém, esta possibilidade não foi abordada diretamente, sendo apenas uma extrapolação dos gradientes de expressão de Pax6, Tbr2 e Tbr1 no telencéfalo dorsal.

Os neurônios GABAérgicos encontrados no córtex são gerados, predominante ou exclusivamente, no telencéfalo ventral e migram tangencialmente para sua posição final (para revisão; Marin & Rubenstein, 2002). Diferentes genes como *nkx2.1*, *dlx-1/2* e *mash1* são expressos por progenitores desta região e parecem exercer um papel na especificação dos interneurônios corticais.

O fator transcricional Mash1, como as Neurogeninas do telencéfalo dorsal, também pertence à família das proteínas bHLH. Camundongos *knock-out* (ko) para esta proteína apresentam uma redução significativa no número de neurônios corticais GABAérgicos (Casarosa et al., 1999) e a sua expressão ectópica por progenitores da zona ventricular dorsal é suficiente para induzir a expressão de Dlx-2 e gerar neurônios GABAérgicos (Fode et al., 2000).

Já os animais ko para *nkx2.1* apresentam uma redução de apenas 50% no número total de neurônios corticais GABAérgicos. No entanto, toda a

subpopulação de interneurônios corticais que expressam parvalbumina e somatostatina parece estar ausente (Xu et al., 2004), indicando um papel do Nkx2.1 na especificação destes subtipos neuronais.

O papel dos fatores transcricionais Dlx-1 e 2 na especificação dos interneurônios corticais não é claro, uma vez que outras proteínas desta família (Dlx5 e 6) poderiam compensar a sua perda. De fato, mutantes com dupla deleção de Dlx-1 e 2 apresentam defeitos na migração tangencial, mas não na especificação GABAérgica dos neurônios gerados no telencéfalo ventral (Anderson et al., 1997). Além disso, a apoptose preferencial de determinadas populações de interneurônios corticais nos camundongos *ko* para *dlx-1* (Cobos et al., 2005) sugere que os genes desta família estejam envolvidos em etapas posteriores a especificação dos precursores telencefálicos para um fenótipo neuronal GABAérgico.

Uma vez que a geração de neurônios e células macrogliais no córtex cerebral ocorre de maneira sequencial (Qian et al., 2000; Morrow et al., 2001), é possível que a especificação de astrócitos e oligodendrócitos dependa mais de sinais extracelulares e do silenciamento dos fatores proneurais nas populações precursoras.

Algumas proteínas bHLH, como Olig1 e Olig2, parecem estar envolvidas na geração de oligodendrócitos (Tekki-Kessarlis et al., 2001; Sussel et al., 2001; Lu et al., 2001) e, provavelmente, astrócitos corticais (Lu et al., 2001). Por outro lado, dados recentes indicam que o Olig2 também estaria envolvido na geração de interneurônios corticais (Miyoshi et al., 2005, resumo SFN).

### **2.3. Genes e ambiente:**

Uma outra questão bastante controversa em relação ao desenvolvimento cortical está relacionada à determinação fenotípica das células neurais. Conceitualmente, poderíamos fazer duas perguntas básicas: 1) a expressão de determinados genes por um progenitor define o seu potencial, o qual permanece imutável se esta célula é colocada em outro ambiente? ou 2) os fatores ambientais são fundamentais para a determinação do potencial de um progenitor e a alteração destes fatores é capaz de alterar este potencial? Na prática, ambos os mecanismos parecem estar relacionados intimamente, determinando, em conjunto, o potencial das células progenitoras em diferentes regiões telencefálicas. Por outro lado, também existem indícios de que, para determinadas populações celulares sob certas influências, os fatores intrínsecos ou alterações ambientais podem ser decisivos à sua determinação fenotípica.

Uma maneira de testar a influência daquelas variáveis *in situ* seria transplantar progenitores de uma determinada região para outra e observar seus comportamentos. Neste sentido, experimentos foram realizados com roedores de diferentes idades embrionárias, nos quais células de determinadas regiões do telencéfalo foram transplantadas iso- ou heterocronicamente, ora no ventrículo lateral, ora diretamente no parênquima. A seguir, discutiremos alguns dos resultados obtidos.

O transplante de células da zona ventricular da eminência ganglionar lateral (EGL) de camundongos E15 marcadas com PKH-26-GL, para o ventrículo

lateral de ratos E16,5-E17,5, mostrou que estas células poderiam incorporar-se tanto ao corpo estriado quanto ao córtex cerebral (Fishell, 1995). Neste caso, o termo “incorporação” refere-se à capacidade de uma célula povoar determinada região, uma vez que a análise foi feita 15 dias após o transplante. Portanto, não podemos excluir a possibilidade das células se integrarem homotopicamente e migrarem para o córtex.

Através da análise morfológica das células transplantadas, o autor sugere que as células da EGL, quando “incorporadas” ao telencéfalo dorsal, respondem a sinais ambientais presentes nesta região e podem originar neurônios piramidais, indicando que “precursores estriatais” teriam seu potencial alterado (Fishell, 1995). A esta altura, precisaríamos considerar alguns pontos: 1) Não foi mostrado que as células transplantadas invadem a zona ventricular do telencéfalo dorsal *in situ*; 2) Células geradas na eminência ganglionar medial migram para o córtex através da EGL, de modo que as células observadas no córtex poderiam ser interneurônios corticais (Wichterle et al., 2001) e 3) A marcação com PKH-26-GL não permitiu uma visualização adequada da morfologia celular. Portanto, apesar de provocativa a hipótese de que progenitores derivados da EGL pudessem gerar neurônios corticais excitatórios quando expostos aos sinais presentes na ZV do telencéfalo dorsal, os dados extraídos deste trabalho não foram muito convincentes.

Em concordância com os resultados discutidos acima, Oliver Brüstle mostrou que células derivadas do córtex, EGM ou EGL de camundongos E14 e transplantadas no ventrículo lateral de ratos em diferentes idades embrionárias

(E16-E18) originariam e/ou se diferenciariam em neurônios e células gliais em regiões cerebrais distintas (Brüstle et al., 1995). Novamente, como a análise da incorporação foi feita em períodos pós-natais, não poderíamos excluir a possibilidade das células derivadas do telencéfalo ventral, por exemplo, integrarem-se homotipicamente e migrarem para o córtex tangencialmente (Marín & Rubenstein, 2001).

Alguns dados sugerem que as células da EGL incorporam-se, preferencialmente, ao estriado, enquanto as células da EGM integram-se, principalmente, ao septo, prosencéfalo basal e hipotálamo (Campbell et al., 1995). Novamente, não ficou claro se as células transplantadas invadiriam pontualmente determinadas regiões do telencéfalo ou se alojariam de maneira difusa por diversas regiões do telencéfalo, sobrevivendo no entanto, em apenas algumas destas regiões.

De maneira geral, poderíamos supor que as células transplantadas nos ventrículos laterais precisariam reconhecer sinais extracelulares que permitiriam suas incorporações em uma ou mais regiões. Naturalmente, a análise dos cérebros recipientes em momentos tardios, após os transplantes, não nos permite avaliar este fenômeno. Por outro lado, o fato de uma célula invadir determinada região telencefálica não é garantia de que esta célula irá sobreviver e integrar-se à circuitaria local e, tampouco, que esta célula adotará um determinado fenótipo.

Em relação à capacidade de uma célula reconhecer determinados sinais nas zonas ventriculares telencefálicas, existem algumas evidências de que o

tratamento das células com tripsina reduz a especificidade com que as células da EGL invadem o parênquima (Olsson et al., 1998). Entre outras coisas, é sugerido neste trabalho que o tratamento com tripsina aumentaria o número de células da EGL capazes de invadir o telencéfalo dorsal 24 a 48h após os transplantes, enquanto esta invasão seria, preferencialmente, no telencéfalo ventral após a simples dissociação mecânica.

Defendendo a idéia de que existe um comprometimento das populações progenitoras com um determinado fenótipo, um trabalho recente descreve a incorporação de células derivadas do telencéfalo dorsal de camundongos E12 após transplante no ventrículo lateral de ratos E16 (Carletti et al., 2004). De acordo com estes autores, as células transplantadas integram-se em diferentes regiões telencefálicas e não-telencefálicas, porém adquirem fenótipos distintos nestas áreas (resumidamente, diferenciariam-se em neurônios no telencéfalo e células gliais nas demais regiões). Interessantemente, são descritas células com propriedades de interneurônios no córtex cerebral, sugerindo que um precursor do telencéfalo dorsal poderia originar estas células. Uma vez que não parece existir geração de interneurônios no telencéfalo dorsal de roedores, seria tentador especular que isto se torna possível quando as células transplantadas são expostas a sinais ambientais ao invadir o telencéfalo ventral.

Como podemos notar, a combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos parece responder à indução de determinados fenótipos, dependendo da população celular analisada, idade embrionária e outros fatores que serão discutidos a seguir. Não obstante, esses fatores também agem de maneira

complementar na especificação de subtipos celulares dentro de uma mesma população progenitora.

Estudando a laminação cortical de furões, foi demonstrado que as células transplantadas para o ventrículo lateral ou, diretamente, na zona ventricular do telencéfalo dorsal migravam para a camada cortical que estaria sendo gerada no momento da obtenção das células, mesmo quando os transplantes eram feitos em períodos mais tardios (McConnell, 1989). No entanto, algumas células migravam para a camada que estava sendo gerada no momento do transplante, o que dependia da fase do ciclo celular em que as células se encontravam no momento de seu isolamento (McConnell & Kaznowsky, 1991). Esses dados sugerem que as células progenitoras poderiam apresentar diferentes capacidades de responder a sinais ambientais, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontrassem. Desta forma, células que estavam na fase S do ciclo celular em E29 (período de geração de neurônios da camada 6) migravam para a camada 2/3 quando transplantadas em P0 (quando estão sendo gerados neurônios destas camadas). Por outro lado, células extraídas 4h após a fase S, quando seus materiais genéticos ainda eram tetraplóides, migravam para a camada 6 (McConnell & Kaznowsky, 1991), sugerindo que a especificação laminar era adquirida logo após a duplicação do DNA e antes da divisão mitótica.

A resposta de células progenitoras do telencéfalo dorsal a sinais ambientais parece diminuir ao longo do desenvolvimento, de modo que progenitores isolados em períodos mais tardios da corticogênese aparentemente

falham em gerar neurônios destinados às camadas mais profundas do córtex, mesmo se transplantados durante a formação destas camadas (Frantz & McConnell, 1996; Desai & McConnell, 2000). Estes dados sugerem que, no início da corticogênese, os progenitores possuiriam capacidade de gerar neurônios de diferentes camadas se expostos ao ambiente adequado, mas, após o estabelecimento de uma ou mais camadas, os progenitores restantes não conseguiriam gerar neurônios destas camadas.

Analisados em conjunto, os dados discutidos acima indicam que existe um balanço entre a ação de fatores extrínsecos e intrínsecos na determinação dos fenótipos celulares. No entanto, algumas perguntas ainda não podem ser respondidas de maneira definitiva: 1) Os progenitores presentes em uma determinada região telencefálica podem adquirir potencial fenotípico de outra? 2) Células do telencéfalo ventral podem invadir outras regiões telencefálicas após o transplante ou a sua dispersão cortical é apenas produzida por migração tangencial? 3) A região através da qual uma célula penetra após os transplantes interfere com o potencial e/ou comportamento desta célula? Para respondermos a estas perguntas seria necessário definir precisamente o potencial dos progenitores de cada uma das áreas avaliadas; analisar, após curtos intervalos de tempo, a incorporação das células transplantadas no tecido hospedeiro; observar o comportamento migratório das células de diferentes origens em posições ectópicas; correlacionar integração, migração e origem com o fenótipo final apresentado pelas células.



### **3. Migração celular durante o desenvolvimento cortical:**

Como foi discutido anteriormente, as células neuronais e macrogliais que formam o córtex cerebral são geradas a partir de diferentes progenitores situados nas zonas germinativas do telencéfalo dorsal e ventral. A partir deste ponto, movimentos migratórios finamente orquestrados são responsáveis pelo posicionamento adequado das células nas lâminas corticais.

Em função da orientação, dois tipos de migração celular são identificáveis no prosencéfalo: a migração radial, em que células migram da zona progenitora no sentido da superfície cerebral, seguindo a disposição radial do tubo neural; e a migração tangencial, em que células migram ortogonais à orientação da migração radial.

Um grande número de evidências dá suporte à hipótese de que os neurônios piramidais do córtex cerebral são gerados exclusivamente na zona ventricular do telencéfalo dorsal e migram radialmente, associados ou não aos prolongamentos de glia radial, para atingir suas posições nas camadas corticais em desenvolvimento (Marin & Rubenstein, 2003). Além disso, as células gliais geradas na zona subventricular pós-natal, possivelmente invadem a placa cortical através de migração radial (Marshall et al., 2003).

Por outro lado, a maior parte, senão a totalidade, dos interneurônios corticais é originada na eminência ganglionar e atinge seu destino através de migração tangencial (Marin & Rubenstein, 2001). Não obstante, algumas evidências sugerem que parte dos oligodendrócitos corticais também são

gerados no telencéfalo ventral e seguem a rota migratória supracitada (Nery et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001).

### **3.1. Migração neuronal:**

#### **3.1.1. Migração radial:**

Estudos audioradiográficos demonstraram que a migração radial no telencéfalo dorsal ocorre em “ondas migratórias”, onde os primeiros neurônios gerados estabelecem uma camada subpial de células denominada pré-placa. Em seguida, uma segunda onda de células divide a pré-placa em zona marginal e, mais profundamente, subplaca, formando a placa cortical entre estas duas camadas. As ondas de neurônios subseqüentes migram através de uma região pobre em células que divide a zona ventricular da placa cortical, denominada zona intermediária, cruzam as células previamente estabelecidas na placa cortical e, finalmente, estacionam na região imediatamente abaixo da zona marginal, estabelecendo uma nova camada de células na placa cortical que, apesar de sua geração mais tardia, situar-se-á em uma região mais superficial do córtex (Angevine & Sidman, 1961; Rakic, 1972). Esta forma de organização cortical é conhecida como “inside-out” (“de dentro para fora”).

Basicamente, dois tipos de migração radial são observados no córtex cerebral em desenvolvimento – locomoção e translocação. No primeiro tipo, os neurônios migram associados a fibras de glia radial e tanto seus corpos

celulares quanto os prolongamentos-líderes movem-se em velocidades muito semelhantes, de modo que seu tamanho é, praticamente, mantido constante (Rakic, 1971a; 1971b; 1972; Edmonson & Hatten, 1987). Já no segundo tipo de migração, os neurônios propelem seus corpos celulares no sentido de seus prolongamentos líderes, previamente estabelecidos e conectados a superfície pial e zona marginal, provocando um encurtamento das células neuronais (Brittis et al., 1995).

Evidências recentes sugerem que estes diferentes modos de migração radial são importantes em momentos distintos da corticogênese. Precocemente, coincidindo com a divisão da pré-placa, os neurônios migrariam, predominantemente, por translocação. Posteriormente, durante o estabelecimento laminar do córtex, predominaria a locomoção, onde os neurônios migratórios estariam associados a fibras de glia radial, apresentando um curto período de translocação no topo da PC (Nadarajah et al., 2001). No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que ambos os tipos de migração estejam presentes ao longo de toda a corticogênese e atuem em conjunto no posicionamento neuronal.

Os neurônios migratórios no córtex cerebral em desenvolvimento devem cessar seu movimento e se estabelecerem na camada adequada. Como foi discutido anteriormente, a distribuição laminar destes neurônios segue um padrão dito “inside-out” (Angevine & Sidman, 1961; Rakic, 1974), que parece mais relacionado à sequência do ciclo celular na zona ventricular do que ao período embrionário (Takahashi et al., 1999). Porém, os fatores que controlam o

posicionamento dos neurônios na camada cortical apropriada são pouco conhecidos.

A interação entre os neurônios migratórios e as células de Cajal-Retzius (CR) parece ser fundamental para este processo, uma vez que a migração celular cessa imediatamente abaixo da zona marginal, onde as células de CR expressam relina, uma glicoproteína secretada e associada a matriz extracelular, cuja mutação provoca distúrbios na laminação cortical (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). No entanto, alguns neurônios são posicionados corretamente no córtex de camundongos *reeler* (animais que não expressam o gene da relina), sugerindo que o posicionamento normal pode ocorrer na ausência de Relina e que a inversão laminar observada nestes animais pode estar relacionada a outras alterações (Caviness, 1982).

O mecanismo de ação da Relina depende de sua ligação aos receptores VLDLR, ApoER2, integrina expressos nas células corticais migratórias (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; Dulabon et al., 2000). A ligação da Relina a um dos seus receptores ativa uma tirosina quinase responsável pela fosforilação da proteína DAB1 que resulta na internalização do complexo envolvendo VLDLR, ApoER2 e integrina (Rice et al., 1998; Howell et al., 1999, 2000; Dulabon et al., 2000; Schmid et al., 2004; 2005). O fenótipo semelhante ao dos camundongos *reeler* observado nos animais mutantes para *Vldlr*, *Apoer2* (Trommsdorff et al., 1999) e *Dab1* (Howell et al., 1997) sugere que Relina, VLDLR, ApoER2 e DAB1 estariam envolvidos na mesma cascata de

sinalização responsável pelo posicionamento correto dos neurônios durante a migração radial.

Diferentes hipóteses foram aventadas para explicar a ação da Relina sobre a laminação cortical. Uma delas é a de que esta molécula agiria como um sinal de parada aos neurônios migrando radialmente. Esta idéia é corroborada pela redução da taxa de migração radial de neurônios expostos a Relina *in vitro* (Dulabon et al., 2000), mas não explica porque as células migratórias param antes da pré-placa nos camundongos *reeler*, tampouco justifica o fato da expressão ectópica de Relina na zona ventricular não impedir a migração neuronal (Magdaleno et al., 2002). Além disso, em fatias organotípicas, foi mostrado que neurônios migratórios são capazes de atravessar um território rico em Relina na ZM e migrar radialmente para fora destas fatias, associados a fibras de glia radial que, aparentemente, estendem-se a partir desta camada (Hedin-Pereira et al., 2000).

A segunda hipótese é que a Relina promova o desligamento dos neurônios migratórios da glia radial. Desta forma, a ausência de Relina produziria uma barreira física aos neurônios migratórios. Esta barreira seria produzida pelas primeiras células a migrarem radialmente e que permaneceriam associadas às fibras de glia radial. No entanto, esta explicação só é válida se pudermos provar que todas as fibras de glia radial no córtex em desenvolvimento dão suporte à migração de neurônios para as diferentes camadas corticais.

Uma terceira interpretação para a atuação da Relina na migração radial é que esta molécula regularia a identidade e função da glia radial. Portanto, os defeitos de migração observados na ausência de sinalização por Relina seriam secundários às alterações na matriz de glia radial (Super et al., 2000). Esta hipótese tem sido corroborada com a demonstração de que células de glia radial expressariam ApoER2, VLDRL e DAB1 (Luque et al., 2003), e que a sinalização por Relina afetaria a morfologia e a maturação bioquímica destas células (Hartfuss et al., 2003).

Recentemente, foi demonstrado que a supressão da expressão de Dab-1 utilizando RNA de interferência provoca defeitos na migração dos neurônios supragranulares, provavelmente através de distúrbios na dendritogênese e a redução do contato destes com a zona marginal, fonte de Relina (Olson et al., 2006).

Uma segunda cascata de sinalização, envolvendo a quinase ciclina-dependente 5 (Cdk5) e suas subunidades ativadoras, p35 e p39, também participa no posicionamento neuronal durante o desenvolvimento do córtex. Camundongos deficientes em Cdk5, p35 ou ambas p35 e p39 apresentam defeitos na laminação cortical (Chae et al., 1997; Gilmore et al., 1998; Ko et al., 2001). Ao contrário dos camundongos *reeler*, a pré-placa é dividida nestes animais, mas o padrão de laminação é alterado da mesma forma que no *reeler*, sugerindo que a cascata da Relina e do p35/Cdk5 devem apresentar funções diferentes durante o desenvolvimento cortical (Gupta et al., 2003).

Recentemente, foi descrita a expressão de um antígeno de superfície nas células de glia radial, distribuído predominantemente no estrato superior da placa cortical, onde os neurônios cessam seu movimento migratório. Esta molécula, denominada “SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*)-like 1”, parece exercer uma função anti-adesiva, promovendo o desacoplamento das células migratórias das fibras de glia radial e promovendo o posicionamento correto destas células no córtex cerebral em desenvolvimento (Gongidi et al., 2004).

### **3.1.2. Migração tangencial:**

O movimento migratório dos neurônios, observado durante o desenvolvimento cortical, orientado perpendicularmente ao radial, recebe a denominação de migração tangencial. Os neurônios que seguem este movimento parecem utilizar diferentes estratégias para sua migração, como será discutido a seguir. No entanto, uma característica comum a este tipo de migração é a quebra de fronteiras regionais entre diferentes subdivisões do prosencéfalo.

Apesar da demonstração antiga de células migrando tangencialmente no córtex em desenvolvimento (Shoukimas & Hinds, 1978; Price & Thurlow, 1988; Walsh & Cepko, 1988), apenas em 1989, Van Eden e colaboradores, a partir da morfologia e a distribuição dos neurônios gabaérgicos no córtex cerebral de

ratos, sugeriram que estas células em migração tangencial na zona marginal, intermediária e sub-placa constituiriam uma população celular distinta.

Adicionalmente, estudos com marcadores de proliferação celular mostraram que as células gabaérgicas geradas em determinado período apresentavam uma posição progressivamente mais medial na zona intermediária conforme o tempo após o qual a sua geração transcorria (DeDiego et al., 1994), sugerindo um gradiente de dispersão látero-medial destas células, perpendicular a orientação dos prolongamentos de glia radial.

No entanto, as primeiras evidências diretas de que os interneurônios gabaérgicos do córtex cerebral seriam originados no *subpallium* e migrariam tangencialmente em direção ao córtex cerebral em desenvolvimento foram obtidas na última década (DeCarlos, 1996; Anderson, 1997; Tamamaki, 1997; Wichterle, 1999; Lavdas, 1999; Sussel, 1999; Corbin, 2001; Letinic, 2002).

Basicamente, três abordagens experimentais foram utilizadas a fim de determinar a origem dos interneurônios corticais gabaérgicos: (1) marcação das células no telencéfalo ventral com cristais de Dil ou DiA; (2) transplante de células do telencéfalo ventral de animais produtores de proteínas repórteres (GFP,  $\beta$ -galactosidase, etc) em fatias do telencéfalo embrionário ou intra-útero; (3) análise de animais transgênicos com defeitos na expressão de genes envolvidos na regionalização do telencéfalo ou na migração das células geradas no subpallium (revisto em Marin & Rubenstein, 2001). A seguir, discutiremos alguns destes resultados em ordem cronológica.



De Carlos e colaboradores (1996) foram os primeiros a demonstrar que células da EGL marcadas com Dil ou DiA entre o 12º e 14º dia embrionário (E12-E14) cruzavam a borda córtico-estriatal e invadiam a pré-placa e a placa cortical em formação. Em seguida, Anderson e colaboradores (1997) separaram o neocórtex do telencéfalo ventral durante o desenvolvimento e observaram uma drástica redução no número de neurônios gabaérgicos no neocórtex. Não obstante, eles demonstraram que a ausência dos genes *dlx-1* e *dlx-2* também reduzia o número de células gabaérgicas migrando para o neocórtex. Estes resultados sugeriram uma origem subcortical – a EGL – para os neurônios corticais gabaérgicos e a dependência dos mesmos da expressão dos genes *dlx-1* e *dlx-2* para sua dispersão ventro-dorsal.

Evidências sugerindo que a EGM seria a origem dos neurônios gabaérgicos que dispersam tangencialmente para o neocórtex não tardaram. Em 1999, Lavdas e colaboradores marcaram células daquela região com Dil e mostraram sua migração tangencial através da zona marginal e sub-placa. Estas células migratórias expressavam Lhx6, um marcador característico da EGM, corroborando os achados com Dil. Neste mesmo ano já havia sido demonstrada a capacidade de células da EGM migrarem tangencialmente para o córtex quando transplantadas no estriado de fatias do cérebro em desenvolvimento (Wichterle et al., 1999).

Além disso, camundongos mutantes para o gene *nkx2.1*, um gene *homeobox* expresso na porção medial do telencéfalo ventral, apresentaram uma redução dos neurônios expressando GABA, *Dlx2* e calbindina que migravam

para o estriado e córtex, reforçando os achados citados anteriormente (Sussel et al., 1999).

Camundongos *ko* para o gene *mash1* também apresentam, além de outros defeitos, uma redução no número de interneurônios corticais, o que pode ser evidenciado pela redução de células imunorreativas ao GABA, Dlx-1 e GAD67 na zona intermediária e marginal (Casarosa et al., 1999), sugerindo que este gene desempenhe um papel na geração ou migração destas células. Uma vez que a ausência deste gene produz defeitos mais pronunciados na EGM, podemos especular que os neurônios gabaérgicos que não atingem o neocórtex daqueles mutantes seriam gerados nesta região do subpallium.

Por outro lado, camundongos *ko* para o gene *pax-6* (envolvido na regionalização do telencéfalo dorsal) apresentam um aumento no número de células migrando tangencialmente do telencéfalo ventral para o neocórtex (Chapouton et al., 1999), sugerindo que o gene *pax6* tenha um efeito oposto ao gene *nkx2.1*, determinando um “caráter dorsal” aos precursores da zona ventricular do telencéfalo dorsal.

Através de transplantes intra-útero de precursores da EGM e EGL foi possível determinar o fenótipo das células geradas nestas regiões e suas rotas migratórias *in situ*. Este paradigma revelou que células geradas na EGL originavam neurônios de projeção do corpo estriado, núcleo acumbente, tubérculo olfatório, além de células granulares e periglomerulares no bulbo olfatório. Por outro lado, a EGM seria o maior sítio de origem dos interneurônios corticais (Wichterle et al., 2001). A não observação de interneurônios corticais

com origem na EGL deve-se, provavelmente, ao período em que foram realizados os transplantes (E13,5), uma vez que a migração tangencial de neurônios gabaérgicos gerados na EGL para o neocórtex parece ocorrer em períodos tardios da corticogênese (Anderson et al., 2001).

Jiménez e colaboradores (2002), através de diferentes paradigmas, estudaram o desenvolvimento de neurônios a partir das eminências ganglionares em diferentes idades e sugeriram que a EGL daria origem a células que migram tangencialmente em períodos iniciais da corticogênese. No entanto, o uso de cristais de Dil na EGL poderia permitir a coloração de células provenientes da EGM, produzindo um artefato de técnica em seus resultados.

A análise da expressão de diferentes proteínas em neurônios gabaérgicos sugere a existência de diferentes subpopulações de interneurônios corticais gerados em diferentes subdivisões das eminências ganglionares (Anderson et al., 2001). Uma vez que defeitos no desenvolvimento de um determinado tipo de interneurônio cortical podem estar relacionados a certos distúrbios psiquiátricos e neurológicos, como esquizofrenia e epilepsia (Xu et al., 2003; Cobos et al., 2005), a identificação dos mecanismos relacionados com a diversidade de neurônios gabaérgicos torna-se fundamental para o entendimento do funcionamento normal do cérebro.

O primeiro artigo a abordar esta hipótese sistematicamente foi publicado pelo grupo de Stewart A. Anderson (Xu et al., 2004). Através do transplante de células GFP-positivas obtidas das diferentes zonas proliferativas do telencéfalo ventral sobre fatias do córtex de animais neonatos, é sugerido que: (1) o

subgrupo de interneurônios que expressam parvalbumina e somatostatina é originado, principalmente, na EGM; (2) interneurônios calretinina-positivos são originados, fundamentalmente, na eminência ganglionar caudal (EGC); (3) diferentes subpopulações de neurônios gabaérgicos são geradas em períodos distintos da corticogênese; (4) camundongos mutantes para Nkx2.1 desenvolvem a EGC normalmente, ao contrário da EGM, e apresentam diminuição no número de interneurônios parvalbumina- e somatostatina-positivos, mas não no número de calretinina-positivos.

Nestes experimentos, os transplantes da EGL deram origem a neurônios gabaérgicos que também expressavam DARPP32, um marcador de neurônios estriatais de projeção, corroborando os achados de Wichterle (1999 e 2001) e Anderson (2001) de que a EGM seria o sítio primário de origem dos interneurônios corticais.

Utilizando esta mesma técnica, foi demonstrado que os interneurônios gerados na eminência ganglionar medial ou caudal apresentam não apenas diferenças na expressão de proteínas ligadoras de cálcio e neuropeptídeo Y, mas também distinguem-se morfológica- e eletrofisiologicamente (Butt et al., 2005).

Em resumo, podemos dizer que: (1) existem evidências substanciais de que a grande maioria, se não a totalidade, dos interneurônios corticais é gerada no telencéfalo ventral; (2) a EGM parece ser o principal sítio de origem destes interneurônios, embora alguns experimentos sugiram uma origem na EGL; (3) a EGC também contribui com a geração de interneurônios corticais; (4) existem

diferentes subpopulações de neurônios gabaérgicos que são gerados em regiões distintas do telencéfalo ventral em períodos diferentes da corticogênese; (5) mutações de deleção em genes relacionados com a regionalização do telencéfalo (ventral x dorsal) alteram a proporção de interneurônios gabaérgicos, inclusive em níveis de subpopulação; (6) *mash1* e *dlx1/2*, genes cujas expressões são alteradas nos mutantes para *nkx2.1* e *gsh2*, respectivamente, são importantes para a geração de interneurônios corticais.

### **3.2. Migração de oligodendrócitos e astrócitos:**

Estudos recentes têm demonstrado que os oligodendrócitos corticais apresentam, pelo menos, três regiões de origem: a eminência ganglionar medial, a lateral e o telencéfalo dorsal (Kessaris et al., 2006). Aqueles gerados no telencéfalo ventral migrariam tangencialmente para o córtex cerebral durante o final do período embrionário (Tekki-Kessaris et al., 2001; Kessaris et al., 2006; Nery et al., 2001), enquanto os gerados na zona subventricular pós-natal invadiriam o córtex através de migração radial (Kessaris et al., 2006; Tue et al., 2006; Marshall et al., 2002; Levison & Goldman, 1997).

Devemos ressaltar que estes movimentos migratórios foram inferidos através da análise da dispersão de precursores gliais durante a corticogênese (Tekki-Kessaris et al., 2001; Nery et al., 2001) e de experimentos em que precursores na zona subventricular pós-natal foram infectados com retrovírus (Levison & Goldman, 1993; 1997; Marshall et al., 2002). No entanto, a

observação direta destes fluxos migratórios, até onde sabemos, ainda não foi relatada; é bastante provável que movimentos radiais e tangenciais estejam envolvidos no posicionamento de uma mesma população glial ao longo do desenvolvimento.

Acredita-se que o desenvolvimento dos astrócitos corticais depende, fundamentalmente, da transformação das células de glia radial iniciada no período peri-natal (Schmechel & Rakic, 1979; Voigt, 1989; Takahashi, 1992; Alves et al., 2001; deAzevedo et al., 2003). Em roedores, uma parte dos astrócitos corticais também parece ser gerada na zona subventricular pós-natal (Levison & Goldman, 1993; 1997; Marshall et al., 2002) e, possivelmente, invadem as lâminas corticais através de movimentos migratórios.

Como podemos observar, os dados sobre o desenvolvimento das células macrogliais do córtex cerebral são escassos. Apesar de tanto oligodendrócitos quanto astrócitos apresentarem grande heterogeneidade, sobretudo associada à suas localizações no cérebro adulto, ainda não se sabe o quanto esta heterogeneidade representaria subpopulações de origens espaço-temporais distintas ou se derivariam de pregenitores específicos regionais.

#### **4. Composição celular da zona marginal ao longo da corticogênese:**

Diferentes tipos neuronais estão presentes na zona marginal durante o desenvolvimento. Em ratos, Gundela Meyer e colaboradores (Meyer et al., 1998) descreveram duas grandes classes de neurônios presentes nos estratos

superiores do córtex em desenvolvimento (pré-placa e zona marginal), com diferentes sítios de origem, morfologias e períodos de sobrevivência. Estas duas classes de neurônios apresentam características bioquímicas diversas, indicando uma grande heterogeneidade entre as células de cada sub-população.

Segundo estes autores, as primeiras células a ocuparem a pré-placa seriam os neurônios pioneiros. Estes, são gerados entre E10 e E11, sendo encontrados, em maior número, no aspecto lateral da vesícula telencefálica, na sua porção rostral, em E11,5. Algumas poucas células ocupam as regiões caudais do telencéfalo, enquanto a sua porção medial parece desprovida destes neurônios. Bioquimicamente, estas células foram caracterizadas pela expressão de Calbindina (CB) e Calretinina (CR), não apresentando imunorreatividade para Relina ou GABA. Ao redor de E13/E14, nota-se a formação de um plexo axonal horizontal a partir dos neurônios pioneiros, com colaterais atingindo a Zona Ventricular, os quais não são visíveis após E14. O plexo, descrito acima, sob a zona marginal parece estender-se caudalmente, formando os primeiros componentes da cápsula interna. Após a divisão da pré-placa, dois tipos de neurônios pioneiros são observados na zona marginal: o primeiro situado na região média, com morfologia horizontal; e um segundo tipo, localizado na parte mais profunda da zona marginal, com morfologia piramidal, apresentando dendritos em contato com a superfície pial e axônios descendentes cruzando a placa cortical e atingindo a subplaca. Nesta camada, estes axônios, juntamente com os axônios gerados na subplaca (De Carlos & O'Leary, 1992), parecem formar primeira via eferente do córtex cerebral em desenvolvimento. Estas

células mantêm suas morfologias até o final da gestação, apesar da imunorreatividade para CB e CR estar reduzida. Finalmente, não são mais visíveis no período pós-natal.

A partir de E12, uma segunda população, formada por pequenos neurônios que expressam GABA, GAD, Relina, CB e CR em diferentes combinações, apareceria na superfície do córtex, imediatamente acima dos neurônios pioneiros e abaixo da pia mater. Estas células formariam a camada granular subpial (CGS) em roedores, homóloga à descrita originalmente em primatas (Meyer et al., 1999). Os neurônios da CGS em ratos seriam gerados entre E10 e E13, segundo estes autores, na área retrobulbar, de onde migrariam tangencialmente para ocupar a zona marginal.

Ainda de acordo com Meyer e colaboradores, a expressão de GABA na zona marginal apresentaria um gradiente látero-medial dependente da idade embrionária. Desta forma, em E14, observou-se células GABA-positivas identificadas morfologicamente com neurônios da CGS, no aspecto lateral do telencéfalo. Em E16, estas células estavam presentes no telencéfalo dorsal, sugerindo que 1) estas células estariam migrando tangencialmente através da zona marginal ou 2) a expressão de GABA pelos neurônios na CGS não seria homogênea.

Entre E18 e os primeiros dias pós-natais, poucas células GABAérgicas são visíveis na zona marginal, sugerindo que estas células: 1) estejam migrando para a placa cortical; 2) possam regular negativamente a produção de GABA; 3) estejam entrando em apoptose. Apesar de experimentos recentes corroborarem



a primeira hipótese (Nadarajah et al., 2002; Ang et al., 2003), a segunda não pode ser inteiramente descartada. Por fim, em P7, neurônios GAD-positivos foram encontrados na camada 1, o que poderia ser interpretado como uma população gerada tardiamente (Meyer et al., 1999).

Por fim, estes autores sugerem que as células de Cajal-Retzius não estão presentes na zona marginal dos ratos durante o desenvolvimento, uma vez que nenhum tipo neuronal descrito acima apresenta as características descritas para aquelas células em primatas. Portanto, as células de Cajal-Retzius teriam que ser geradas no período pós-natal ou se diferenciarem a partir dos neurônios da CGS, uma vez que os neurônios pioneiros não estão mais presentes após o nascimento.

O termo “célula de Cajal-Retzius” foi inicialmente aplicado para um grupo de neurônios que ocupam a zona marginal embrionária em humanos, apresentam um prolongamento radial ascendente, em contato com a superfície pial, e um plexo axonal localizado na região mais profunda da zona marginal. Estas células foram descritas por Retzius e Cajal, através do método de Golgi, no final do século XIX, em cérebros obtidos em diferentes períodos gestacionais. Originalmente, os neurônios desenhados por estes dois cientistas já apresentavam morfologias bastante distintas, o que poderia estar relacionado com os diferentes períodos gestacionais do material, variações do método de Golgi ou diferentes técnicas de desenho e magnificação (revisto por Marin-Padilla, 1998).

Apesar de haver um consenso de que elementos homólogos às células de Cajal-Retzius estão presentes na zona marginal de mamíferos não-primatas, onde apresentariam uma morfologia muito mais simples do que a descrita em humanos, as características fenotípicas destas células ainda são motivo de controvérsias e a maioria das publicações sobre o assunto é pouco criteriosa quanto ao uso do termo “células de Cajal-Retzius”, o que torna muito difícil a comparação entre os resultados descritos nestes estudos.

Um dos principais critérios utilizados para a definição das células de Cajal-Retzius tem sido a expressão de Relina (Ogawa et al., 1995). Seguindo este critério, poderíamos atribuir quatro sítios de geração para estas células: *pallium* (Hevner et al., 2003); *cortical hem* (Takiiguchi-Hayashi et al., 2004); sulco córtico-estriatal (Bielle et al., 2005) e telencéfalo ventral (Jiménez et al., 2003).

A maneira pela qual estas diferentes populações de células produtoras de Relina estariam envolvidas na laminação cortical ainda não foi definida. Recentemente, demonstrou-se que o *cortical hem* é a principal fonte de células produtoras de relina na zona marginal, mas que a ablação genética dos seus precursores não provoca os defeitos de laminação encontrados nos camundongos *reeler* (Yoshida et al., 2006), sugerindo que outras fontes de Relina teriam efeito compensador.

Além das diferentes populações neuronais encontradas na zona marginal, outras populações celulares, como precursores oligodendrocitários, também são encontradas nesta região em momentos intermediários da corticogênese (Tekki-

Kessarlis et al., 2001; Nery et al., 2001; este trabalho). Além disso, dados prévios do nosso laboratório indicam que células da zona marginal apresentam capacidade proliferativa em momentos tardios da corticogênese em fatias e explantes (deMoraes, 2003, Dissertação de Mestrado).

Curiosamente, explantes da zona marginal de hamsters E15, estendem longos processos radiais imunorreativos para GFAP, indicando que a zona marginal poderia abrigar uma população de células de glia radial (deMoraes, 2003, Dissertação de Mestrado). Conforme apresentado acima, estas células são capazes de gerar neurônios e astrócitos durante o desenvolvimento cortical (Takahashi et al., 1992; Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2002; 2004; Malatesta et al., 2003; Miyata et al., 2002).

Estas evidências sugeriam que a zona marginal de roedores poderia conter células progenitoras no fim da embriogênese, pelo menos quando mantidas em cultura. Neste trabalho, portanto, pretendemos investigar a existência de células progenitoras na zona marginal de camundongos em diferentes períodos embrionários *in situ* e avaliar o potencial gliogênico e neurogênico destes prováveis progenitores através de análises clonais.

A possibilidade de a zona marginal ser uma nova região germinativa no desenvolvimento cortical é extremamente atraente, pois as células nesta região estariam, dentre outras coisas, expostas a sinais ambientais diferentes daqueles encontrados nas zonas ventricular e subventricular. Sendo assim, os progenitores na zona marginal seriam uma potencial fonte de tipos celulares

distintos daqueles gerados nas demais regiões germinativas, contribuindo para a diversidade celular encontrada no córtex cerebral.

## II. Objetivos:

- Avaliar a existência de células progenitoras na zona marginal *in situ*;
- Analisar a expressão de genes relacionados a linhagens neuronais ou gliais pelos progenitores na zona marginal;
- Determinar o potencial dos progenitores isolados da zona marginal através do estudo de linhagens clonais *in vitro*;
- Avaliar a influência de mutações em genes pró-neuronais sobre a população de progenitores na zona marginal.

### **III. Materiais e métodos:**

#### **1. Animais:**

Os animais selvagens utilizados neste estudo foram os camundongos C57/Bl6, obtidos da Charles River, Inc. (M.A.,EUA).

O camundongo Pax6<sup>Sey</sup> (sey/sey) é caracterizado por uma mutação pontual no gene pax6, responsável pela expressão de uma forma não-funcional da proteína (Hill et al., 1991). Estes camundongos foram mantidos como heterozigotos através de cruzamentos com C57/Bl6, reconhecidos pelo seu fenótipo (olhos reduzidos). Os heterozigotos foram cruzados entre si para a obtenção de embriões homozigotos, caracterizados pela ausência de olhos.

Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12h e com alimentação *ad libitum*. O dia da detecção do plug vaginal foi considerado como o dia embrionário zero (E0).

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as leis do Brasil e da União Européia para a experimentação com animais e foram previamente aprovados pelo comitê de ética das instituições envolvidas.

#### **2. Obtenção de cortes histológicos:**

Fêmeas grávidas em diferentes idades embrionárias (E14, E16 e E18) foram anestesiadas por inalação com dietil-éter e sacrificadas por deslocamento

cervical. Os embriões foram removidos por histerectomia e mantidos em tampão HBSS (“Hanks buffered salt solution”) com HEPES 10mM. Com o auxílio de duas pinças, os cérebros foram removidos das caixas cranianas e imersos em solução de paraformaldeído 4% em PBS (tampão fosfato salina) por diferentes intervalos de tempo: cérebros E14 - 2h; cabeça E14 - 3 e 5h; cérebros E16 - 3h; cérebros E18 - 4h à 4°C. Após lavagem com PBS por 10 min, os cérebros ou cabeças foram transferidos para uma solução de sacarose 30% em PBS e mantidos a 4°C para crioproteção. Por fim, o tecido foi embebido em Tissue-tek e secções coronais de 20 µm foram obtidas em criostato (Leica). Estas secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e estocadas a -20°C.

### **3. Incorporação de BrdU *in situ*:**

Para a detecção de células proliferativas no cérebro embrionário, foram administradas injeções de Bromodeoxiuridina (BrdU - Sigma) na cavidade peritoneal dos camundongos em diferentes idades gestacionais, na concentração de 50mg/Kg de peso corporal, diluído em PBS a 10mM. Após 30 minutos, os camundongos foram sacrificados e os embriões foram removidos e tratados conforme descrito anteriormente.

#### **4. Cultura de células:**

Camundongos C57/Bl6 no início do décimo-sexto dia embrionário (E15) foram retirados por cirurgia em fêmeas grávidas e mantidos em solução de HBSS+HEPES em gelo. Após a extração da caixa craniana, os cérebros foram seccionados em fatias coronais de 200 $\mu$ m com o auxílio de um fatiador (McIlwain Tissue chopper). As fatias obtidas foram mantidas a 4°C por 30 min, a fim de reduzir a morte celular provocada pela ação de proteases liberadas durante a secção. No fim deste período, a parede lateral do telencéfalo era dividida em duas porções, uma metade inferior que concentra, portanto, as células precursoras da zona ventricular e zona subventricular, além de alguns neurônios pós-mitóticos gerados nestas regiões, e uma metade superior, composta por neurônios da placa cortical, subplaca e células da zona marginal. Por simplicidade, denominaremos as culturas celulares obtidas da região inferior e superior da parede cortical respectivamente ZV/ZSV e ZM. Os fragmentos de tecido obtidos após a subdissecção foram tratados com Tripsina-EDTA 1x em HBSS por 15 min à 37°C, a fim de digerir as proteínas de matriz extracelular e ligantes para receptores de membrana celular, facilitando a dissociação do tecido. Este processo era interrompido pela adição de DMEM/10% soro fetal bovino (SFB)/ 1% penicilina e estreptomicina (PS). A dissociação mecânica dos fragmentos teciduais era realizada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, cuja abertura era previamente rondilhada. As células obtidas eram lavadas três vezes em DMEM/10%SFB e precipitadas por 5 minutos de centrifugação a 1000rpms.



A seguir, eram contadas com o auxílio de câmara de Neubauer após a adição do corante Azul de Trypan, que permite a identificação das células mortas. Por fim, as células eram plaqueadas em densidades entre  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  células por  $\text{cm}^2$  sobre lamínulas previamente tratadas com Poli-D-Lisina e mantidas em 500  $\mu\text{l}$  de DMEM/10%SFB/1% penicilina e estreptomicina a  $37^\circ\text{C}$  em 5% $\text{CO}_2$ /95% $\text{O}_2$  na presença de BrdU 10 $\mu\text{M}$ . As culturas eram mantidas por até 10 dias in vitro.

#### **4.1. Infecção viral das culturas celulares:**

A infecção viral era realizada duas horas após o plaqueamento com o retrovírus contendo o gene da proteína fluorescente verde, GFP, sob o controle do promotor da  $\beta$ -actina (Hack et al., 2004). A quantidade de vírus utilizada era dependente da titulação do mesmo ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml) e fora calculada para a obtenção de 25 a 50 clones por lamínula. No dia seguinte, eram adicionados 500 $\mu\text{l}$  de meio de cultura SATO (Bottenstein & Sato, 1979) ou DMEM F12/1% PS/3,5 $\mu\text{M}$  glicose/2% B27. Ao fim de 72h de cultivo, 50% do meio de cultura era substituído pelo meio condicionado utilizado previamente (SATO ou B27). Imediatamente antes da fixação, as células eram lavadas com PBS e então mantidas em paraformaldeído a 4% por 15 min. Em seguida, as células eram novamente lavadas com PBS por três vezes e processadas para imunocitoquímica (adiante).

## 5. Imunocitoquímica:

Para a detecção de BrdU, os cortes histológicos e culturas celulares foram submetidos a pré-tratamento com ácido clorídrico 2N por 30', seguido por duas incubações de 15' em tampão tetraborato de sódio 0,1M (pH8,5) e três lavagens de 10' em PBS. Seguiu-se a incubação dos cortes com o anticorpo primário (anti-BrdU, Abcam) de pernoite.

### 5.1. Anticorpos primários e secundários:

Lâminas contendo as secções telencefálicas ou lamínulas com as culturas celulares foram incubadas por 24h com os anticorpos primários em solução de PBS 10 mM/0,5% Triton-X100/10% soro normal de cabra (NGS) a 4°C em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados neste estudo e as diluições utilizadas estão listados na tabela.

Após três lavagens de 10' em PBS 10 mM, o material foi reincubado com os respectivos anticorpos secundários, conjugados a diferentes fluoróforos (tabela), por 2h a temperatura ambiente.

#### 5.1.1. Tabela de anticorpos primários:

Nome	Produzido em/ diluição	Pré- tratamento	Marcador de	Origem
Anti-βIII-Tubulina	Mouse (IgG2b; 0.5% Tx, 10%	30' em 0,5% Tx, 10% NGS	Neurônios	Sigma (T8660)

	NGS)			
Anti-BrdU	Mouse (IgG1, 1:10)	HCl 2N por 30', tampão borato pH 8,5 por 15' (2x)	Marcador de fase S do ciclo celular	Bio-Science Products (010198)
Anti-BrdU	Rat (1:200)	HCl 2N por 30', tampão borato pH 8,5 por 15' (2x)	Marcador de fase S do ciclo celular	Abcam (ab6326)
Anti-GFP	Chicken (1:500, 0.5% Tx, 10% NGS)		Proteína fluorescente GFP	Sigma
Anti-GFP	Rabbit (1:500, 0.5% Tx, 10% NGS)		Proteína fluorescente GFP	Clontech
Anti-GFAP	Mouse (IgG1, 1:100, 0.5% Tx, 10% NGS)	0.5% Tx, 10% NGS	Células astrogliais	Sigma (G3893)
Anti-Ki67 (Tec-3)	Rat (1:50, 0.5% Tx, 10% NGS)	Fervura em tampão citrato 0,01M de sódio por 8'	Células proliferativas	Dako (dia 333-67)
Anti-Mash1	Mouse (IgG1, 1:2; 0.5%Tx, 10% NGS)	Fervura em tampão citrato 0,01M de sódio por 8'	Fator transcricional bHLH expresso por células subpaliais	Gentilmente cedido por F.Guillemot
Anti- nestina	Mouse (IgG1, 1:4, 0.5% Tx, 10% NGS)		Células gliais, precursors.	Developmental Hybridoma Bank (rat- 401)
Anti-Ngn2	Mouse (IgG2a, 1:10, 0.5% Tx, 10% NGS)		FT expresso por precursores na ZV do TD	Gentilmente cedido por D.Anderson
Anti-Olig2	Rabbit (1:1000, 0.5% Tx, 10% NGS)		FT expresso por precursores gliais	Gentilmente cedido por D.Rowitch
Anti-O4	Mouse (IgM, 1:1000)		Oligodendrócitos	Gentilmente cedido por J.Price
Anti-Pax6	Rabbit (1:300, 0.5% Tx, 10% NGS)	Fervura em tampão citrato 0,01M de sódio por 8'	FT expresso por precursores na ZV do TD	Babco (PRB-278P)
Anti-Pax6	Rabbit (1:1000, 0.5% Tx, 10% NGS)	Fervura em tampão citrato 0,01M de sódio	FT expresso por precursores na ZV do TD	Chemicon (AB 5409)

		por 8'		
Anti-PH3	Rabbit (1:200, 0.5% Tx, 10% NGS)		Marcador de células mitóticas	Upstate Biotech (06-570)
Anti-Reelin (142 and E4)	Mouse IgG1 (1:500, 0.5% Tx, 10% NGS)		Células de Cajal-Retzius e alguns interneurônios GABAérgicos	André Goffinet, University of Louvain, Medical School, Brussels, Belgium
Anti-Tbr2	Rabbit (1:2000; 0.5% Tx, 10% NGS)	HCl 2N por 30', tampão borato pH8,5 por 15' (2x)	FT expresso por precursores da ZSV dorsal	Gentilmente cedido por R. Hevner

### 5.1.2. Tabela de anticorpos secundários:

Nome	Origem
Anti-rabbit Ig FITC / TRIC / biotinylated	Jackson ImmunoResearch / Dianova
Anti-rabbit Ig Cy2	
Streptavidin AMCA	Vector Laboratories
Anti-rat FITC / TRIC	(Jackson ImmunoResearch)
Anti-mouse IgG1 FITC / TRIC / biotinylated	EuroPath Ltd.
Anti-mouse IgG2b FITC / TRIC / biotinylated	(Southern Biotechnology Associates)
Anti-mouse IgM FITC / TRIC / biotinylated	

### 5.2. Visualização dos núcleos celulares:

Os núcleos das células foram corados com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenil-indol) 0,02 mg/ml em PBS por 10', seguido por três lavagens de 10' com PBS 10 mM (DAPI forma complexos fluorescentes com o DNA, através da sua ligação a regiões ricas em AT, que são excitados com comprimento de onda de 460 nm).

Os espécimes foram montados em Aqua Poly/Mount (Polysciences, Northampton, UK) e analisadas por microscopia confocal (Olympus FV1000) ou fluorescência (Zeiss Axioplan2; Zeiss AxioCam HRM).

## **6. Análise clonal *in vitro*:**

Dado o baixo número de partículas virais utilizadas na transfecção das culturas, podemos considerar grupos de células GFP-positivas vizinhas como pertencentes ao mesmo clone (Haubst et al., 2005). Os tipos celulares e o número de células por clone foram quantificados após sete dias de cultivo através de microscopia de fluorescência (Zeiss Axioplan2; Zeiss AxioCam HRM).

A definição dos tipos de clones foi baseada nos tipos celulares encontrados, a partir de imunomarcação para Tuj1, GFAP e O4, além de critérios morfológicos. Resumidamente encontramos clones “neurônais puros”, ou seja, clones contendo apenas células Tuj1-positivas; “mistos”, contendo pelo menos uma célula Tuj1-positiva e uma Tuj1-negativa; e clones “gliais puros”, ou seja, formados por células exclusivamente Tuj1-negativas.

Devido à possibilidade teórica de que clones apresentassem neurônios imaturos Tuj1-negativos, associamos alguns critérios morfológicos na definição das células gliais x neuronais, como o tamanho dos corpos celulares (menor em neurônios) e o diâmetro dos prolongamentos celulares (maiores em células gliais). Em todos os casos nos quais não houve imunomarcação para Tuj1 identificamos claramente a morfologia glial relatada acima.

## **7. Análise quantitativa:**

Para todos os grupos de dados, parâmetros como medidas de tendência central, desvios, intervalo de confiança e testes estatísticos foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism 3.02.

### **7.1. Número de células proliferativas *in situ*:**

Para a determinação do número de células proliferativas na zona marginal, foram quantificados os números de células BrdU e PH3-positivas em relação ao total de células DAPI-positivas na porção dorso-lateral do telencéfalo em três diferentes idades: E14, E16 e E18. A borda lateral desta região de análise era estabelecida traçando-se uma linha ortogonal à parede ventricular na junção entre as zonas ventriculares do neocortex e da eminência ganglionar. A borda medial era definida subtraindo-se da região de análise a parede telencefálica medial.

Foram escolhidas secções nos níveis rostral, intermediário e caudal de cinco diferentes animais, gerados em duas ou três ninhadas, nas três idades estudadas. O número de secções analisadas para cada caso foi:

1. E14 BrdU: trinta-e-três
2. E14 PH3: trinta-e-oito
3. E16 BrdU: quarenta-e-sete
4. E16 PH3: cinquenta-e-três

5. E18 BrdU: trinta-e-cinco

6. E18 PH3: quarenta-e-sete

Uma célula foi considerada pertencente à zona marginal quando seu núcleo (corado pelo DAPI) estava localizado além do ponto distante a quatro núcleos celulares da região de alta densidade celular, característica da placa cortical (Boulder Committee, 1970).

## **7.2. Fenótipo das células proliferativas *in situ*:**

Células BrdU-positivas foram analisadas quanto à expressão dos fatores transcricionais Pax6, Tbr2 e Olig2.

Para o Pax6, foram analisadas 17 secções em E14 (total de 20 células BrdU-positivas) e 21 secções em E16 (52 células BrdU-positivas). Em E18, não foram encontradas células Pax6-positivas na zona marginal.

O fator transcricional Tbr2 também não foi encontrado em qualquer célula da zona marginal, eliminando a necessidade de quantificações.

A colocalização da imunomarcação para BrdU e Olig2 foi averiguada em 33 secções em E14 (24 células BrdU-positivas), 28 secções em E16 (44 células BrdU-positivas) e 20 secções em E18 (81 células BrdU-positivas), através de microscopia confocal (Olympus FV1000).

### **7.3. Células apoptóticas na zona marginal:**

Ensaio TUNEL e imunocitoquímica para caspase-3 ativada, combinado a imunomarcação para BrdU, foram realizados em secções telencefálicas obtidas em E14, E16 e E18. A presença de células duplamente marcadas para BrdU e um dos marcadores de células apoptóticas citados foi avaliada em 12 secções de cada animal, nos níveis rostral, intermediário e caudal

### **7.4. Células BrdU, Pax6 e Tbr2-positivas *in vitro*:**

Após duas horas *in vitro* na presença de BrdU 10 $\mu$ M, uma lamínula contendo células da zona marginal ou da ZV/ZSV obtida em cada experimento de cultura (total de seis experimentos independentes) foi fixada e processada para imunocitoquímica com anti-BrdU e anti-Tbr2 ou anti-Pax6, e os núcleos celulares foram corados pelo DAPI. Em seguida, foram fotografados quatro campos com densidades celulares (núcleos DAPI-positivos) semelhantes em cada lamínula. As imagens obtidas foram digitalizadas através do programa AxioVision e o número de células BrdU-positivas/Tbr2 ou Pax6-positivas e BrdU-positivas/Tbr2 ou Pax6-negativas foi quantificado (total de 20 imagens de cada cultura), em relação ao total de núcleos DAPI-positivos.

Em apenas um caso as culturas foram descartadas devido ao elevado número de células Tbr2-positivas e seus valores não foram computados.



## **7.5. Incorporação do material genético viral por células proliferativas**

### ***in vitro:***

Após dois dias de cultivo, quatro lamínulas contendo células da zona marginal (duas lamínulas) ou da ZV/ZSV (duas lamínulas) obtidas de dois experimentos de cultura independentes foram fixadas e processadas para imunocitoquímica com anti-GFP, e os núcleos celulares foram corados pelo DAPI. Em seguida, foram fotografados cinco a seis campos com densidades celulares (núcleos DAPI-positivos) semelhantes em cada lamínula. As imagens obtidas foram digitalizadas através do programa AxioVision e o número de células GFP-positivas (total de 11 imagens de cada cultura) foi quantificado em relação ao total de núcleos DAPI-positivos.

Nestas mesmas imagens, foram quantificados o número de células GFP-positivas por clone da zona marginal (30 clones) e da ZV/ZSV (40 clones). A comparação estatística entre os valores encontrados foi realizada através do teste de Mann-Whitney (teste-t, não-pareado, não-paramétrico), com o auxílio do programa GraphPad Prism 3.02.

## **7.6. Frequência dos diferentes tipos de clones *in vitro*:**

Após 7 a 10 dias de cultivo, os clones celulares gerados por progenitores isolados da ZV/ZSV ou da zona marginal foram classificados da maneira descrita anteriormente (análises clonais). No total, foram analisados 97 clones

nos cultivos de zona marginal (sete lamínulas; três experimentos independentes) e 100 clones nos cultivos de ZV/ZSV (cinco lamínulas; três experimentos independentes).

### **7.7. Número de células por clone:**

O número de células nos diferentes tipos de clone (neuronal puros, mistos ou gliais puros) foi quantificado através da imunorreatividade ao GFP e Tuj1 ou GFAP. Os critérios utilizados na definição do tipo celular (neuronal x glial) foram os mesmos descritos na sessão “análises clonais”. Foram analisados 64 clones mistos, 3 gliais puros e 33 neurais puros nos cultivos de ZV/ZSV, enquanto 10 mistos, 54 gliais puros e 16 neurais puros nos de zona marginal. Os números médios de células neurais e gliais por tipo de clone foram calculados e comparados estatisticamente (Unpaired t-test) com o auxílio do programa GraphPad Prism 3.02.

Além disso, os clones gliais puros e mistos foram analisados em relação a expressão de GFAP. Apenas os clones em que todas as células eram exclusivamente GFAP-positivas ou GFAP-negativas foram quantificados e os valores encontrados nos cultivos de zona marginal (37 clones) e ZV/ZSV (24 clones) foram comparados estatisticamente (ANOVA, Turkey's Multiple Comparison Test).

### **7.8. Expressão de Relina por neurônios gerados *in vitro*:**

Após 7 dias de cultivo, os clones neuronais puros ou mistos gerados por progenitores isolados da ZV/ZSV ou da zona marginal foram analisados quanto a presença de neurônios GFP-positivos/Relina-positivos. No total, foram analisados 34 e 36 clones nos cultivos de zona marginal e ZV/ZSV, respectivamente, obtidos em dois experimentos independentes.

### **7.9. Número de células proliferativas na zona marginal de camundongos *sey/sey in situ*:**

O número de células BrdU ou PH3-positivas, em relação ao total de células DAPI-positivas, na zona marginal dos camundongos *small eye (Sey/sey)*, foi quantificado da mesma maneira descrita acima. Os valores encontrados foram comparados aos de animais selvagens obtidos na mesma ninhada. No total, foram analisadas 40 secções de animais selvagens e 19 dos *Sey/sey* para BrdU e PH3. A comparação estatística entre os valores encontrados foi realizada através do teste de Mann-Whitney (teste-t, não-pareado, não-paramétrico), com o auxílio do programa GraphPad Prism 3.02.

#### **IV. Resultados:**

##### **1. Células na zona marginal apresentam capacidade proliferativa:**

Através da administração de Bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da base orgânica nitrogenada timidina, e posterior identificação desta molécula por métodos imunohistoquímicos, pudemos identificar células em fase S na zona marginal, indicando que elas são capazes de duplicar o seu DNA, uma característica de células progenitoras.

Como podemos observar na figura 1, um pequeno número de células da zona marginal é capaz de incorporar BrdU durante os 30 minutos de sobrevida em camundongos E14, E16 e E18. Este curto intervalo de tempo foi escolhido para eliminar a possibilidade de que células que tivessem incorporado BrdU em outras regiões pudessem migrar para a zona marginal. Confirmando os dados da literatura, um grande número de células mostraram-se imunorreativas para BrdU na porção basal da zona ventricular (posição em que as células ainda estão na fase S do ciclo celular) e na zona subventricular (Figura 1A) (Takahashi et al., 1992; 1995).

Uma outra maneira de avaliar a divisão celular é pela presença de proteínas envolvidas na fase M do ciclo celular. Dentre estas, investigamos a forma fosforilada da histona 3 (PH3), expressa no final de G2 e durante a mitose. Pudemos observar um elevado número de figuras mitóticas ao longo da superfície ventral do ventrículo lateral (Figura 2A), distribuição característica dos

precursores da zona ventricular (Rakic, 1974), e uma população proliferativa secundária na zona subventricular (Takahashi et al., 1995; Noctor et al., 2004). Além disso, figuras mitóticas imunorreativas para o anticorpo anti-PH3 foram observadas na zona marginal (Figura 2A), indicando a ocorrência de divisões celulares nesta zona.

A proporção de células imunorreativas para BrdU ou PH3 em função do número total de células na zona marginal evidenciado pelo marcador nuclear fluorescente, DAPI foi quantificada em três diferentes estágios do desenvolvimento (Figura 3). Foram analisadas secções níveis rostral, caudal e intermediário provenientes em E14, E16 e E18 (ver métodos para detalhamento)

Vale ressaltar que, apesar da proporção de células BrdU-positivas na zona marginal entre E14 ( $M=0,45$ ;  $SEM=0,0863$ ) e E16 ( $M=0,5421$ ;  $SEM=0,06034$ ) permanecer praticamente inalterada (Figura 3C), parece haver um aumento absoluto do número destas células em E16 (Figura 7E), acompanhado de um aumento do número total de células nesta região. Esta tendência de aumento da quantidade de progenitores na zona marginal também pode ser observada em E18, quando a proporção de células BrdU-positivas nesta região ( $M=1,44$ ;  $SEM=0,09913$ ) praticamente triplica em relação a E14 e E16.

Como podemos observar (Figura 3), o número de figuras mitóticas em E14 ( $M=0,2134$ ;  $SEM=0,05967$ ) e E16 ( $M=0,1775$ ;  $SEM=0,03123$ ) é, aproximadamente, 1/3 a 1/2 do número de células BrdU positivas, o que poderia ser explicado pela relação entre as durações da fase S e M. Por outro lado, em

E18, o número de células PH3 positivas na zona marginal ( $M=0,2714$ ;  $SEM=0,03216$ ) é 1/6 do observado com BrdU, o que poderia ser provocado por (1) alterações nos parâmetros de ciclo celular destes progenitores ao longo do desenvolvimento (2) mudanças na composição da população ou (3) a ocorrência de divisões celulares em regiões vizinhas à ZM. Sustentando esta última hipótese, encontramos um número significativo de células PH3 positivas na placa cortical em E18, paralelamente a uma escassez de células BrdU-positivas.

## **2. Progenitores na zona marginal não expressam Pax6 e Tbr2:**

Durante o desenvolvimento cortical, diferentes fatores de transcrição são expressos por células progenitoras e estão envolvidos na especificação de diferentes tipos e subtipos celulares (Schurmanns & Guillemot, 2002). O fator transcricional Pax6, por exemplo, está expresso nas células proliferantes da zona ventricular do telencéfalo dorsal, conferindo-lhes um potencial neurogênico (Heins et al., 2002). Uma vez que um pequeno número de células da zona marginal expressa Pax6 (Hartfuss et al., 2001), investigamos se as células proliferantes da ZM expressavam este gene.

Virtualmente, todas as células na zona ventricular em E14 expressam Pax6 (Figura 4B) e uma fração destas células capaz de incorporar BrdU encontra-se na porção basal da ZV (Figura 4C). .

Ao longo do desenvolvimento, o número de células Pax6-imunorreativas na zona ventricular é reduzido, o que é consistente com a redução do número de

células proliferativas nesta zona, o aumento do número de precursores intermediários na zona subventricular (Takahashi et al., 1995) e o término do período de neurogênese para o córtex cerebral. Na zona marginal, células Pax6-positivas podem ser encontradas em E14 e E16 (Figuras 5A e 5B), mas estas células não incorporam BrdU (Figuras 5B e 5C). Em E18, encontramos raras células BrdU-positivas na zona marginal (dado não mostrado). Em todas as idades embrionárias estudadas, nenhuma célula proliferativa (BrdU-positiva) na zona marginal apresentou imunorreatividade para o Pax6.

O fator transcricional Tbr2 está presente em células da zona subventricular e tem sido associado com a geração de neurônios corticais pelos precursores intermediários desta zona (Englund et al., 2005). Além disso, um pequeno número de neurônios na placa cortical apresenta este fator de transcrição e não é de nosso conhecimento a análise de sua expressão na zona marginal.

A figura 6A mostra a distribuição desta proteína nas células da zona subventricular. Observe que a maioria, se não todas as células BrdU positivas nesta zona também apresentam imunorreatividade para Tbr2, enquanto nenhuma célula proliferativa na zona marginal o faz (Figura 6). Em raros casos, foram encontradas células Tbr2-positivas na parte superior da placa cortical, mas estas células não eram BrdU-positivas.

### **3. Olig2 é expresso por progenitores na zona marginal a partir de E16:**

O fator de transcrição Olig2 tem sido largamente associado com a geração de oligodendrócitos e astrócitos durante o desenvolvimento (Tekki-Kessaris et al., 2001; Nery et al., 2001; Marshall et al., 2005). Inicialmente, o RNA-mensageiro (RNAm) deste fator transcricional está restrito a populações celulares do telencéfalo ventral; ao longo da corticogênese, observa-se um espalhamento desta marcação na direção do telencéfalo dorsal, seguindo um gradiente látero-medial (Tekki-Kessaris, 2001).

Através de técnicas imunohistoquímicas, observamos a expressão do fator transcricional Olig2 no telencéfalo embrionário em E14, E16 e E18. Na figura 7, observa-se um exemplo desta imunomarcação em E16, onde podemos observar células Olig2-positivas na porção lateral do telencéfalo dorsal, ocupando a zona intermediária, placa cortical e zona marginal (Figura 7B).

Realizamos também ensaios de marcação com BrdU e imunomarcação com Olig2 no intuito de verificar se as células Olig2 positivas encontravam-se em processo de proliferação. Resumidamente, observamos que, em E16, as células BrdU-positivas na porção mais lateral do telencéfalo dorsal expressavam Olig2, enquanto os demais progenitores na zona marginal não o faziam (Figura 8). Em E18, todas as células proliferativas na zona marginal expressavam Olig2 (Figura 8E), sugerindo (1) que as células progenitoras Olig2-negativas, observadas na



zona marginal em E14, tenham sido substituídas por uma segunda população de células Olig2-positivas oriundas do telencéfalo ventral ou (2) que os progenitores zona marginal supra-regulem a expressão de Olig2 temporal- e espacialmente. Também poderíamos supor que ambos os fenômenos possam contribuir para a alteração fenotípica observada nos progenitores da zona marginal ao longo da embriogênese.

#### **4. Progenitores na zona marginal proliferam *in vitro*:**

Com o intuito de avaliar a progênie das células proliferativas na zona marginal em períodos intermediários da corticogênese, Como podemos observar na figura 9E, a cultura ZS/ZSV apresenta uma elevada capacidade proliferativa, indicada pela incorporação de BrdU nas primeiras duas horas após o plaqueamento. Consistente com a origem destes progenitores, cerca de 80% das células BrdU-positivas expressam Pax6 (figura 10E), enquanto as restantes expressam o fator transcricional Tbr2 (Figura 9E).

Por outro lado, as culturas ZM apresentam um número reduzido de células proliferativas e menos de 10% destas células expressam Tbr2 (Figura 9), o que pode indicar (1) uma pequena contaminação por células da ZSV nesses cultivos ou (2) a presença de células Tbr2-positivas na zona marginal que não foram identificadas em nossas análises *in situ* devido a sua baixa frequência e/ou a baixa eficácia na incorporação de BrdU em intervalos curtos de tempo.

Consistente com nossos resultados *in situ* (Figuras 4 e 5), não encontramos células proliferativas nos cultivos de zona marginal expressando o fator transcricional Pax6 (Figura 10).

Para acompanharmos a progênie dos progenitores presentes na zona marginal, as células em cultivo foram infectadas com retrovírus carregando o gene para a proteína fluorescente verde GFP após duas horas de cultivo. Estes vírus são caracterizados pela sua incapacidade de reprodução e pela incompetência de transportar seu material genético para o núcleo de células não mitóticas. Desta forma, apenas as células em mitose durante o período de atividade viral incorporam o seu material genético contendo o gene da proteína GFP, a qual é transmitida para as células-filhas, que a expressam permitindo a análise dos clones gerados a partir de um progenitor.

A efetividade da infecção viral foi atestada após dois dias *in vitro*, quando pudemos observar grupos de células imunorreativas para GFP (Figura 11). Tanto nas culturas de células das zonas ventricular e subventricular quanto nas de zona marginal observamos que todas as células GFP positivas expressavam o marcador de células progenitoras nestina (Figura 11).

Apesar do número de clones em ambos os cultivos ser semelhante, devido ao baixo número de partículas infectantes utilizadas em nossos experimentos, a porcentagem de células GFP-positivas em relação ao número total de células nas culturas de ZV/ZSV após 2 dias *in vitro* era maior do que nas culturas de zona marginal ( $p < 0.0001$ ; Mann-Whitney test; Figura 12), indicando que o número médio de células por clone deveria ser diferente nestes dois

cultivos. De fato, os clones gerados por progenitores isolados da ZV/ZSV apresentam números de células mais elevados ( $M=2,2$ ;  $SEM=1,3$ ) do que os da zona marginal ( $M=1,5$ ;  $SEM=0,51$ ;  $p=0,037$ , Mann Whitney test; figura 13).

## **5. Progenitores na zona marginal apresentam elevado potencial gliogênico *in vitro*:**

Após sete a dez dias *in vitro* a composição dos clones de células GFP-positivas nas culturas de zona marginal e das zonas ventriculares e subventriculares foi avaliada através de métodos imunocitoquímicos. Fundamentalmente, três tipos de clones foram encontrados: (1) gliais puros; (2) neuronais puros e (3) mistos (Figuras 14 a 17).

Nos cultivos de células das zonas ventriculares e subventriculares mais de 96% dos clones continham neurônios (Tuj1-positivos, com corpos celulares pequenos e prolongamentos delgados), sendo que mais de 70% dos clones eram exclusivamente neuronais (Figuras 14 e 18). Os clones mistos, na maioria dos casos, apresentaram de um a dois neurônios e um número variável de células não neuronais (Figura 15) de natureza glial, conforme sugerido por critérios morfológicos (grandes corpos celulares e prolongamentos calibrosos) (Figura 14A') e pela expressão de GFAP ou O4 (fotomicrografias não mostradas). Por fim, observamos uma pequena fração de clones contendo apenas células gliais (Figura 18; fotomicrografia não mostrada).

Por outro lado, células da zona marginal em cultura geraram um elevado percentual de clones contendo apenas células gliais (Figuras 16, 17 e 18) e, com menores frequências, clones mistos e neuronais puros (fotomicrografias não mostradas; Figura 18), indicando um potencial neurogênico dos progenitores isolados da zona marginal (cerca de 31% dos clones apresentavam neurônios; Figura 18).

A análise dos diferentes tipos de clones em relação aos números de células componentes mostrou que os neuronais puros gerados por progenitores da ZV/ZSV tendem a apresentar maior número de neurônios ( $M=3,72$ ;  $SEM=0,26$ ;  $N=64$ ) do que os da zona marginal ( $M=2$ ;  $SEM=0,26$ ;  $N=16$ ;  $p<0.05$ ; Unpaired t-test; Figura 19). Por outro lado, os clones gliais puros encontrados nas culturas de zona marginal podem apresentar até 90 células ( $M=18,3$   $SEM=2,7$ ;  $N=54$ ), enquanto o maior clone glial puro encontrado em cultivos de ZV/ZSV apresentava menos de 15 células ( $M=11,33$ ;  $SEM=0,88$ ;  $N=3$ ; Figura 19).

Os clones mistos apresentavam, na maioria dos casos, 1 a 2 neurônios e números variáveis de células gliais em ambas as culturas. No entanto, alguns clones deste tipo derivados de progenitores da ZV/ZSV apresentaram de 10 a 20 neurônios ( $M=3,1$ ;  $SEM=0,72$ ;  $N=33$ ), o que não foi observado em culturas de zona marginal ( $M=1,3$ ;  $SEM=0,21$ ;  $N=6$ ; Figura 19). Por outro lado, o número de células gliais nos clones mistos derivados de progenitores da zona marginal era maior ( $M=19,1$ ) do que os da ZV/ZSV ( $M=10,9$ ;  $p<0.05$ ; Unpaired t-test).

Clones mistos ou gliais puros apresentam células com diferentes imunorreatividades aos anticorpos utilizados neste estudo (O4 e GFAP), de modo que muitas vezes foram observados clones contendo células Tuj1-negativas/GFAP-positivas e Tuj1-negativas/GFAP-positivas, por exemplo (Figura 20). No entanto, as células Tuj1-negativas encontradas nestes clones apresentam morfologias semelhantes, sugerindo tratar-se do mesmo tipo celular (Figura 20).

Através da tripla marcação para GFP, GFAP e O4, observamos que dentro de um mesmo clone as células gliais eram ou GFAP-positivas e GFAP-negativas ou O4-positivas e O4-negativas, mas nunca GFAP-positivas e O4-positivas (fotomicrografias não mostradas), indicando que um mesmo progenitor glial não apresenta potencial para a geração de oligodendrócitos ou astrócitos.

A frequência de clones (mistos e gliais puros) contendo todas as células gliais GFAP-positivas nos cultivos de zona marginal foi levemente maior do que nos de zona ventricular e subventricular (Tabela I), sugerindo que os progenitores da zona marginal apresentam um maior potencial astrogliogênico sob as mesmas condições de cultivo. Além disso, observamos que clones astrocitários (todas as células GFP-positivas/Tuj1-negativas são GFAP-positivas) nos cultivos de zona marginal apresentavam menores números de células do que aqueles contendo células GFAP-negativas ( $p < 0,05$ , Turkey's Multiple Comparison Test; Figura 21).

## **6. Neurônios gerados por progenitores isolados da zona marginal não expressam Relina:**

Uma vez que a zona marginal apresenta uma população neuronal produtora de relina, decidimos investigar se as células geradas a partir de progenitores da zona marginal expressariam esta proteína.

Através de métodos imunohistoquímicos, analisamos 22 clones neuronais puros e 12 clones mistos nos cultivos de zona marginal e comprovamos que os neurônios destes clones não expressam relina (Figura 120). Da mesma forma, não foi observada a geração de neurônios relina positivos em cultivo de células das zonas ventricular e subventricular, indicando que estas células não são descendentes de progenitores localizados no telencéfalo dorsal em E15 (dados não mostrados).

## **7. Camundongos small eye apresentam um aumento no número de progenitores na zona marginal:**

Os camundongos *sey/sey* apresentam uma mutação natural caracterizada pela produção de uma forma não funcional da proteína Pax6 (Hill et al., 2001) expressa no telencéfalo dorsal de roedores (Walther & Gruss, 1991). A perda da função desta proteína está associada com defeitos na regionalização telencefálica (Stoykova et al., 2000) e com um menor potencial neurogênico dos progenitores corticais (Haubst et al., 2004).

Estudos de linhagem celular em cultura de células dissociadas do telencéfalo dorsal de camundongos *sey/sey* revelam um aumento do número de clones gliais em relação aos selvagens (Haubst et al., 2004), sugerindo um aumento no número de progenitores comprometidos com linhagens gliais. Por este motivo, decidimos investigar se a população progenitora na zona marginal, altamente gliogênica, estaria aumentada nos camundongos *sey/sey*.

Semelhante aos animais selvagens, o maior número de células proliferativas nos camundongos *sey/sey* está localizado nas zonas ventricular e subventricular, mas um número pequeno de células mantém a capacidade proliferativa na zona marginal (figura 21). Sobretudo, revelamos que a proporção de células BrdU+ na zona marginal dos camundongos *sey/sey* é cerca de três vezes maior do que nos selvagens (figura 21C), aproximando-se do que observamos entre E14 e E18 nestes animais (figura 3C). De que maneira este aumento no número de progenitores no *small eye* está relacionado com um maior potencial gliogênico da zona marginal em momentos precoces da corticogênese ainda está em investigação.

## **V. Discussão:**

A identificação das diferentes populações progenitoras do córtex cerebral e seus potenciais de geração de diferentes tipos celulares é fundamental para o entendimento da formação daquela estrutura e dos mecanismos relacionados a patologias congênitas.

Nesse trabalho, demonstramos a existência de uma população progenitora na zona marginal de camundongos com o potencial de gerar neurônios e células macrogliais. Além disso, nossos dados indicam que esta população pode aumentar numericamente no cérebro de animais com anormalidades na neurogênese, sugerindo que mecanismos compensatórios possam interferir para manter a homeostase do córtex cerebral. Portanto, o córtex cerebral provavelmente sofre pressões genéticas e ambientais que podem vir a influenciar a quantidade e a diversidade de tipos celulares que contribuem para sua função.

### **1. Progenitores na zona marginal *in situ*:**

Em períodos tardios da embriogênese de roedores (E15 em hamster), foi demonstrado que fatias telencefálicas e explantes da zona marginal apresentavam elevada capacidade proliferativa (deMoraes et al., 2003 dissertação de Mestrado). Utilizando dois diferentes paradigmas experimentais, capazes de identificar células em fase S ou M do ciclo celular, conseguimos



demonstrar que células da zona marginal também apresentam capacidade proliferativa *in situ*.

O número de células identificadas através da incorporação do análogo da timidina - BrdU - ou expressão da forma fosforilada da histona 3 - PH3 - na zona marginal é significativamente menor do que o observado nas demais zonas proliferativas (ventricular e subventricular), o que pode ter contribuído para a pouca atenção dispensada para aquela população celular na literatura. Além disso, a existência de células proliferativas na pia-máter (meningeoblastos) pode ter contribuído para a interpretação dos progenitores descritos neste trabalho como elementos proliferativos da pia-máter, deslocados desta camada na direção da zona marginal por artefato de técnica.

De modo a reduzir estas possíveis interferências, utilizamos os seguintes critérios para definir esta população: 1) apenas os quatro primeiros núcleos celulares acima da placa cortical, definida como uma zona de alta densidade celular (Boulder Committee, 1970), foram considerados pertencentes à zona marginal; 2) cortes histológicos nos quais a pia-máter encontrava-se descontínua não foram considerados para a análise de células proliferativas; 3) critérios morfológicos foram associados à expressão de PH3 na definição de figuras mitóticas; e 4) somente núcleos celulares com níveis de BrdU comparáveis (microscopicamente) aos das células da zona ventricular ou subventricular foram quantificados. Com estes critérios, é bastante provável que tenhamos subestimado o número de células capazes de incorporar BrdU ou em

divisão celular nos nossos experimentos, mas esperamos ter reduzido o número de falso-positivos.

Desta forma, encontramos entre 0,5% e 1,5% do total de células da zona marginal analisado em fase S e menos de 0,3% em fase M nas diferentes idades estudadas.

Apesar de mantida a proporção de células BrdU-positivas na zona marginal em E16, comparativamente a E14, registramos um aumento significativo do número absoluto de células BrdU-positivas na zona marginal naquela idade. Entretanto, o número de núcleos celulares (corados por DAPI) na região de análise em E16 é cerca de 2 a 3 vezes maior do que em E14, provavelmente devido a invasão da zona marginal por células provenientes do telencéfalo ventral (Anderson et al., 2001; Marin & Rubenstein, 2001), mantendo a proporção de células proliferativas nesta região praticamente constante.

Em E18, por sua vez, a proporção de células BrdU-positivas na zona marginal é cerca de três vezes maior do que em E16. Associado, ainda, ao aumento do número total de células na zona marginal em E18, concluímos que a atividade proliferativa desta população em períodos tardios da embriogênese aumenta e também seu potencial de contribuição para o povoamento do córtex.

Devido ao aporte de células pós-mitóticas oriúndas da eminência ganglionar à zona marginal (Anderson et al., 2001), escolhemos um intervalo curto de tempo entre a administração de BrdU e a fixação dos tecidos (30 minutos), de modo a eliminarmos a contagem destas células em nossos experimentos.

Além disso, células pós-mitóticas migram radialmente no sentido da zona marginal oriundas de camadas mais internas do telencéfalo dorsal (Caviness et al., 1982) e poderiam interferir em nossas análises. Consideramos a sua possível interferência, no entanto, improvável, pois o intervalo de 30 minutos até a fixação é insuficiente para que os precursores da zona ventricular do telencéfalo dorsal progridam da fase S para a mitose (Takahashi et al., 1993) ou para que neurônios gerados na zona subventricular migrem para os estratos superiores da placa cortical (Noctor et al., 2004).

Contabilizamos números absolutos e percentuais de células em fase S (BrdU-positivas) e e em fase M (PH3-positivas). Se as células estiverem distribuídas randomicamente entre as diferentes fases do ciclo celular (Nowakowsky et al., 1988), os números são proporcionais à duração das fases S ( $T_s$ ) e M ( $T_m$ ) em relação ao total do ciclo celular ( $T_c$ )

Obviamente, a razão  $T_s/T_c$  não leva em conta a possível contribuição de células que estarão entrando na fase S durante os 30 minutos que se seguem à administração de BrdU. Assumimos, no entanto, que esta seja uma interferência negligível devido ao baixo número de células na população e à longa duração da fase G1 em relação à fase S.

Por fim, assumindo que as células que duplicam seu DNA na zona marginal dividem-se nesta mesma região, a razão entre o número de células BrdU e PH3-positivas corresponderá à razão  $T_s/T_m$ . O cálculo destas frações nos diferentes períodos pré-natais poderiam refletir uma mudança nos parâmetros do ciclo celular dos progenitores da zona marginal ao longo do

desenvolvimento embrionário. De fato, registramos uma diminuição gradual da razão Ts/Tm. Curiosamente, essa relação é praticamente constante na zona ventricular ( $\sim 1/2$ ) entre E11 e E16, e a alteração do ciclo celular nesta zona germinativa ocorre através da expansão da fase G1 (Takahashi et al., 1995), sugerindo que os progenitores desta região e da zona marginal apresentem diferentes mecanismos de controle proliferativo.

Outras explicações para as variações na razão Ts/Tm nos progenitores da zona marginal seriam morte celular após a fase S ou a ocorrência de divisões celulares em outras regiões que não a zona marginal. Reforçando esta última hipótese, encontramos figuras mitóticas no estrato superior da placa cortical em E18, sugerindo uma invasão de progenitores a partir da zona marginal.

Com relação à morte celular programada, ensaios TUNEL e imunocitoquímica para caspase-3 revelaram um baixo número de células apoptóticas na zona marginal nas idades estudadas e nenhuma destas células havia incorporado BrdU durante 30 minutos de sobrevivência (dados não mostrados).

## **2. Especificação dos progenitores da zona marginal *in situ*:**

Durante o desenvolvimento cortical, diferentes fatores transcricionais são expressos por células progenitoras na zona ventricular/subventricular e são associados com a especificação de diferentes fenótipos neurais (Schurmmans & Guillemot, 2002; Bertrand & Guillemot, 2002).

A fim de determinarmos possíveis contribuições dos progenitores da zona marginal na geração de neurônios e macroglia, investigamos a expressão de genes envolvidos na especificação destes tipos celulares por aquelas células.

No telencéfalo dorsal, os fatores transcricionais Pax6 e Tbr2 estão associados com a geração de neurônios na zona ventricular e subventricular, respectivamente (Heins et al., 2002; Haubst et al., 2005; Englund et al., 2005). Uma vez que o primeiro é expresso por células na zona marginal (Hartfuss et al., 2001) e o segundo é encontrado em algumas células na placa cortical (Englund et al., 2005) e pré-placa em momentos precoces da corticogênese (Cappelo & Götz, comunicação pessoal), decidimos avaliar se eles estariam expressos nos progenitores da zona marginal.

Através de reações imunohistoquímicas, observamos que nenhuma das células BrdU-positivas na zona marginal em E14, E16 e E18 expressam Pax6 e Tbr2.

Conquanto o fator transcricional Pax6 estivesse presente em um pequeno número de células na zona marginal, possivelmente em células produtoras de relina (Hartfuss et al., 2001), o Tbr2 não foi encontrado em nenhum tipo celular desta região. Curiosamente, o número de células Pax6-positivas em E18 foi muito menor do que nas demais idades analisadas, o que está de acordo com a redução do número de células produtoras de relina no período perinatal (Meyer et al., 1998).

Outros fatores associados à geração de neurônios, como as neurogeninas 1 e 2 no telencéfalo dorsal, e mash1 no telencéfalo ventral (Fode

et al., 2000) não foram avaliados neste estudo, mas hibridizações *in situ* para estes genes demonstram que o RNA mensageiro de neurogeninas está restrito a zona ventricular dorsal, enquanto o do mash1 é confinado à zona ventricular das eminências ganglionares (Fode et al., 2000; Schmidt & Götz, comunicação pessoal).

Além de fornecer dados sobre o potencial das células progenitoras na zona marginal, a análise dos fatores transcricionais citados anteriormente também poderiam sugerir as possíveis origens destas células. Resumidamente, a expressão de Tbr2, Pax6 ou Neurogeninas indicariam uma origem dorsal, enquanto a expressão de Mash1, ventral (Schurmmans & Guillemot, 2002).

Por fim, investigamos a expressão de Olig2 pelos progenitores da zona marginal. A este fator trascricional tem sido atribuída uma identidade ventral e tem sido fortemente associado à geração de oligodendrócitos (Nery et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001) e interneurônios (Miyoshi et al., SFN abstract) durante a embriogênese telencefálica, e de oligodendrócitos e astrócitos na zona subventricular pós-natal (Marshall et al., 2005).

Em E14, a expressão de Olig2 está restrita à zona ventricular das eminências ganglionares e a um pequeno número de células dispersas pelo primórdio estriatal, como já havia sido descrito para seu RNA mensageiro (Tekki-Kessarlis et al., 2001). A partir de E16, células Olig2-positivas são encontradas nas zonas subventricular e intermediária do telencéfalo dorsal e na região mais lateral da zona marginal e placa cortical.

Um grande número de células proliferativas BrdU positivas na zona subventricular e intermediária expressam Olig2 em E16, indicando que progenitores destas regiões já começam a adquirir uma especificação glial. Dentre as células proliferativas na zona marginal nesta idade, cerca da metade corresponde à população Olig2-positiva.

Finalmente, em E18, as células Olig2-positivas estão dispersas por toda a zona marginal e, praticamente, todas as células proliferativas são Olig2-positivas. Também neste período, a maior parte dos progenitores na zona subventricular e intermediária expressam Olig2 e podemos observar a “invasão” destas células na placa cortical. Este gradiente ventro-dorsal de Olig2 no telencéfalo, tem sido interpretado como resultado da migração de precursores oligodendrocitários a partir das eminências ganglionares (Nery et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001). Seguindo esta linha de raciocínio, poderíamos sugerir que a população de progenitores da zona marginal encontrada em E14 é gradualmente substituída e/ou acrescida de células provenientes do telencéfalo ventral, de modo que, no período peri-natal, é formada inteiramente por estas células, caracterizadas pela expressão de Olig2.

Alternativamente, poderíamos supor que a transição neurogênese-gliogênese (Qian et al., 2000) obedeça ao gradiente neurogênico ao longo do telencéfalo (Bayer & Altman, 1991). Desta forma, genes envolvidos na especificação de células macrogliais, como o Olig2, deveriam ser expressos primeiro nas regiões laterais do telencéfalo dorsal, onde o intervalo neurogênico finda mais cedo (Miyama et al., 1997). Logo, a população de células Olig2-

positiva seria descendente dos progenitores observados na zona marginal em períodos intermediários da corticogênese.

São necessários mais experimentos para avaliarmos estas hipóteses e é provável que tanto a migração de progenitores Olig2-positivos quanto uma possível re-especificação de precursores da zona marginal contribuam para o gradiente de expressão de Olig2 pelos progenitores descritos neste trabalho. Além disso, dados indicando que precursores Olig2-positivos possam contribuir para a geração de interneurônios corticais (Miyoshi et al., 2005) e de motoneurônios espinhais (Zhou et al., 2002) indicam que a expressão deste fator pode estar associada à gliogênese e neurogênese no telencéfalo.

### **3. Potencial dos progenitores da zona marginal:**

Nas últimas décadas, uma série de experimentos foi realizada com o intuito de avaliar o potencial precursor de células corticais *in situ* (Luskin et al., 1988; 1993; Walsh & Cepko, 1988; 1992; 1993; Paranaivelas et al., 1991; Price & Thurlow, 1993; Grove et al., 1993; Mione et al., 1994; Reid et al., 1995; McCarthy et al., 2001; Reid & Walsh, 2002) e *in vitro* (Temple, 1989; Davis & Temple, 1994; Williams & Price, 1995; Qian et al., 1997; 1998; 2000). No entanto, por limitações de ordem técnica, estes estudos não identificam o precursor em análise.

Alguns experimentos recentes relataram o potencial neurogênico de populações específicas de células (Malatesta et al., 2000; 2003; Noctor et al.,



2002; 2004; Haubensak et al., 2004), mas, como foi discutido na introdução, há muitas controvérsias nos critérios utilizados para a caracterização destas populações.

A distância física entre a zona marginal e as demais zonas proliferativas do telencéfalo dorsal nos permitiu estudar, independentemente, o potencial dos progenitores residentes na zona marginal através da sua separação mecânica.

Utilizando técnicas microcirúrgicas, a parede cortical de camundongos E15 foi dividida em dois estratos contendo as zonas ventricular, subventricular e intermediária (ZV/ZSV) ou a placa cortical e zona marginal (ZM). Nesta idade, tanto o número quanto o fenótipo dos progenitores na zona marginal não diferem dos descritos em E14 (dado não mostrado).

Tanto as células da ZV/ZSV quanto as da zona marginal mantiveram suas capacidades proliferativas em cultura e a análise fenotípica das mesmas, duas horas após a dissociação, revela a eficiência da técnica de dissecação empregada na separação destas populações: 1) 80% das células proliferativas na ZV/ZSV expressam Pax6 e as 20% restantes, Tbr2 e 2) Poucas células Pax6-positivas são encontradas nos cultivos de zona marginal, mas não apresentam capacidade proliferativa, indicada pela incorporação de BrdU.

A presença de células Tbr2-positivas nos cultivos de ZM, apesar da completa ausência destas células na zona marginal *in situ*, indica uma discreta contaminação destas culturas por células da zona subventricular e/ou expressão de Tbr2 por neurônios da placa cortical (Englund et al., 2005). Porém, mais de 90% das células BrdU-positivas nestes cultivos, após 2h *in vitro*, não expressam

Tbr2, indicando que a contaminação por progenitores da zona subventricular, se verdadeira, é bastante baixa.

A fim de determinarmos o potencial dos diferentes progenitores isolados da ZV/ZSV ou da zona marginal, utilizamos um paradigma experimental baseado na incorporação do material genético de vetores retrovirais por células em divisão mitótica. Desta forma, a linhagem de uma célula pode ser reconstruída através da análise da expressão de um gene repórter contido nos retrovírus (Price et al., 1987).

Utilizando um reduzido número de partículas virais por lamínula, minimizamos a probabilidade de formação de clones sobrepostos ou próximos o suficiente para estabelecer contiguidade. Portanto, interpretamos que cada um dos conjuntos de células GFP-positivas estaria representando uma, e somente uma progênie clonal (Williams & Price, 1995; Hack et al., 2000; Haubst et al., 2004).

Após dois dias de cultura, podíamos observar a expressão da proteína GFP por pequenos grupos de células tanto nas culturas de ZV/ZSV quanto nas de zona marginal. Apesar do número de clones em ambas as culturas ser semelhante, devido ao uso do mesmo número de partículas virais, o número de células por clone nesta fase era muito maior nas culturas de ZV/ZSV, indicando que os progenitores destas regiões apresentam parâmetros de ciclo celular diferentes daqueles dos progenitores da zona marginal. Fundamentalmente, apesar de não termos medido diretamente as durações dos ciclos celulares, os diferentes tamanhos dos clones encontrados sugerem que as células isoladas

da ZV/ZSV proliferam mais rápido do que as da zona marginal durante as primeiras 48h de cultivo.

### **3.1. Estudo das linhagens celulares *in vitro*:**

A análise da composição dos clones gerados nos cultivos de ZV/ZSV e zona marginal após 7-10 dias *in vitro*, através de técnicas imunohistoquímicas, revelou a existência de três tipos de clones: neuronal puro, misto ou glial puro.

Os clones contendo exclusivamente neurônios (Tuj1-positivos) apresentaram um pequeno número de células, sendo que a frequência de clones com mais de duas células foi muito maior nos cultivos de ZV/ZSV, sugerindo que progenitores destas regiões apresentam uma maior frequência de divisões assimétricas, típicas em situações em que se gera neurônios e outro progenitor. A presença de clones formados por um único neurônio é um evento raro (6/84) e poderia ser explicada pela morte da segunda célula ou pela incorporação do material genético viral por uma única célula-filha durante a mitose.

Por outro lado, os clones mistos, na maioria dos casos (20/36), apresentavam uma única célula neuronal e um variado número de células Tuj1-negativas, imunorreativas a O4 ou GFAP. Curiosamente, apenas nos cultivos de ZV/ZSV, foram observados clones mistos contendo mais de dois neurônios (4/26), indicando um maior potencial neurogênico para os precursores destas regiões.

O número médio de células gliais nos clones mistos é maior nos cultivos de zona marginal, sugerindo que progenitores bi-potentes nesta região apresentam um maior potencial gliogênico do que os isolados da ZV/ZSV.

Em contraposição ao baixo número de clones gliais puros nos cultivos de ZV/ZSV (3,3%), cerca de 70% dos progenitores presentes na zona marginal geram exclusivamente células macrogliais. Da mesma forma que nos clones mistos, não foram observados clones gliais puros contendo astrócitos (GFAP) e oligodendrócitos (O4) ao mesmo tempo.

Curiosamente, a frequência de clones gliais ou mistos contendo oligodendrócitos ou astrócitos pode ser alterada pelas condições de cultivo (William & Price, 1995; dados não mostrados deste trabalho). Desta forma, culturas mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino durante os dez dias de cultivo geram, quase exclusivamente, clones astrocitários, enquanto as culturas mantidas em DMEM F12 com B27 a partir do segundo dia apresentam apenas clones oligodendrocitários.

Estes achados sugerem que um mesmo progenitor macroglial pode ser condicionado para a geração de oligodendrócitos ou astrócitos, mas não apresenta a capacidade de gerar estes dois tipos de células ao mesmo tempo. Uma possibilidade é a de que a transição neurogênese-gliogênese observada em progenitores isolados (Qian et al., 2000) seja responsável, num primeiro momento, pela geração de um progenitor glial que, dependendo dos sinais externos, adquira o potencial de gerar astrócitos ou oligodendrócitos.

Analisando os diferentes grupos celulares em conjunto, vimos que um grande número de clones derivados de progenitores da zona ventricular ou subventricular apresenta neurônios (mais de 96%), enquanto apenas 31% dos clones derivados de progenitores da zona marginal contêm células neuronais. Apesar de reduzida, esta proporção é cerca de três vezes aquela correspondente à células Tbr2/BrdU<sup>+</sup> (ou seja, supostamente derivadas de precursores de SVZ) encontradas após duas horas de cultivo, indicando um potencial neurogênico na zona marginal independente da possível contaminação dos cultivos por células da zona subventricular.

Esse potencial neurogênico na zona marginal é extremamente interessante, pois indica uma nova região de geração de neurônios corticais. Como foi largamente discutido ao longo deste trabalho, o nicho onde uma célula neuronal é gerada influi diretamente no seu fenótipo, de modo que a zona marginal poderia contribuir para o aumento da diversidade celular no córtex cerebral adulto.

Apesar da frequência de clones neuronais puros nos cultivos de VZ/SVZ estar próxima dos valores descritos na literatura, a de clones gliais puros encontrada neste estudo é muito menor (Williams & Price, 1995; Malatesta et al., 2000). Embora as populações celulares estudadas sejam distintas, acreditamos que o principal motivo desta discrepância seja o silenciamento do gene repórter em neurônios, o que faria com que um clone misto fosse erroneamente classificado como glial puro. De fato, em todos os clones mistos analisados, a intensidade de fluorescência do GFP nas células neuronais foi menor do que

nas demais. Reforçando esta possibilidade, neurônios derivados de neurosféricas da SVZ adulta apresentam níveis reduzidos de GFP após 7 dias *in vitro* (Berninger & Götz, comunicação pessoal) e células *in situ* apresentam silenciamento de genes repórteres após injeção de retrovírus no ventrículo lateral de embriões (Gaiano et al., 1997).

Em relação ao tamanho das progênes gliais nos clones de ZV/ZSV e zona marginal, observamos que o número médio de astrócitos por clone era muito menor do que o de oligodendrócitos, sugerindo que, ao menos nestas condições, os progenitores astrocitários apresentam uma menor capacidade de auto-renovação ou as condições de cultivo *in vitro* induzem sua diferenciação mais precocemente. Embora clones gliais sejam observados em culturas de ZV/ZSV e zona marginal, os clones contendo astrócitos eram mais frequentes nestas últimas, sugerindo um maior potencial astrogliogênico na zona marginal.

Em humanos, a transformação de glia radial não parece ser uma fonte importante de astrócitos para as camadas supragranulares (deAzevedo et al., 2003) e tipos astrocitários específicos, como as “comet cells”, são encontrados na camada 1 de primatas (Marin-Padilla, 1998). Seria interessante investigar se estas células são geradas por progenitores presentes na zona marginal. Por fim, analisamos a composição dos diferentes tipos de clone quanto ao número de células neuronais ou gliais. Notavelmente, os clones derivados de progenitores da ZV/ZSV apresentavam uma maior probabilidade de conter um elevado número de neurônios, tanto nos clones neuronais puros quanto mistos. Por outro

lado, clones com números relativamente elevados de células gliais (acima de 40) foram observados apenas nas culturas de zona marginal.

Curiosamente, os clones encontrados nas culturas de ZV/ZSV eram maiores do que os da zona marginal após 2DIV, mas após 7 dias a cultura de zona marginal apresenta uma maior frequência de clones com número elevado de células, especialmente gliais. Considerando que a mesma transição neurogênese-gliogênese descrita na literatura (Qian et al., 2000) ocorre nos progenitores isolados da zona marginal, poderíamos sugerir que as células geradas nos primeiros dias de cultivo seriam neurônios (por este motivo os clones derivados de progenitores da ZV/ZSV são maiores após 2DIV) e, em seguida, apareceriam progenitores gliais com elevado potencial proliferativo (mais frequentes nos cultivos de zona marginal).

Em conjunto, estes dados indicam a existência de progenitores na zona marginal com propriedades distintas daqueles encontrados na ZV/ZSV quando cultivados sob as mesmas condições, demonstrando a existência de um novo tipo de progenitor no córtex cerebral.

Devido ao contato da zona marginal com a lâmina basal (Alvarez-Buylla & Lim, 2004), sua baixa densidade celular (Boulder Committee, 1970), relação com vasos perfurantes (Marín-Padilla, 1985) e composição celular (Meyer et al., 1998), será interessante avaliar a interferência destas variáveis sobre o potencial dos progenitores encontrados nesta região.

#### **4. Fenótipo dos neurônios gerados na zona marginal:**

A existência de progenitores neurais na zona marginal nos leva a consideração sobre os subtipos neuronais gerados nesta região. Diferentes populações neuronais capazes de produzir relina, uma proteína importante para a laminação cortical (Caviness et al., 1982; Ogawa et al., 1995; D'Arcangelo et al., 1995; 1997), são geradas em diferentes regiões telencefálicas (Hevner et al., 2002; Jiménez et al., 2003; Takiiguchi-Hayashi et al., 2004; Bielle et al., 2005) de onde migram radial ou tangencialmente para a zona marginal. No entanto, a geração local destas células ainda não foi descrita.

Em nosso modelo experimental, os progenitores derivados da zona marginal apresentam potencial neurogênico, mas não encontramos qualquer neurônio produtor de relina em três experimentos independentes, sugerindo que estas células não seriam geradas localmente.

Outros marcadores neuronais, como GABA e GAD67, foram testados, com o intuito de avaliarmos os subtipos neuronais gerados na zona marginal, mas a análise dos resultados foi dificultada por problemas técnicos, de modo que ainda permanece incerta a natureza dos neurônios gerados por progenitores da zona marginal.



## **5. Efeito de mutações sobre a proliferação na zona marginal:**

Os camundongos *small eye* (Sey/sei) expressam uma forma não funcional da proteína Pax6 (Hill et al., 1991), apresentando defeitos na regionalização telencefálica (Stoykova et al., 2000) e neurogênese (Haubst et al., 2004).

A análise da zona marginal destes animais em E14 revelou um aumento do número de células proliferativas em relação aos selvagens, coincidente com o aumento do número de divisões abventriculares descrito na literatura (Haubst et al., 2004).

Seria tentador especular que a maior velocidade do ciclo celular em períodos precoces da neurogênese em camundongos Sey/sei (Estivill-Torrus et al., 2002) acelere a transição para o período gliogênico (Qian et al., 2000), o que seria responsável pelo aumento no número de progenitores na zona subventricular e marginal, importantes zonas gliogênicas (Marshall et al., 2003; este trabalho). No entanto, ainda precisamos investigar o potencial gliogênico x neurogênico dos progenitores na zona marginal destes camundongos.

Além disso, o aumento do número de células produtoras de relina na zona marginal de camundongos sei/sei (Stoykova et al., 2003) pode estar relacionado com o aumento da frequência de células BrdU-positivas nesta região, sugerindo um papel da Relina sobre o controle da proliferação celular na zona marginal.

## **6. Conclusões finais:**

Neste trabalho, demonstramos a presença de células proliferativas na zona marginal de roedores *in situ*, situando essa região entre as demais zonas germinativas do telencéfalo embrionário.

Através de experimentos de cultura, mostramos que os progenitores isolados da zona marginal apresentam expressão gênica, capacidades proliferativas e potenciais neuroNO- ou gliogênicos diferentes daqueles isolados da ZV/ZSV, indicando a existência de um novo tipo de progenitor no desenvolvimento cortical.

Por fim, observamos que mutações em genes associados à neurogênese cortical podem provocar um aumento do número de progenitores na zona marginal.

Além da importância destes progenitores para o desenvolvimento do córtex cerebral, que potencialmente contribuiriam para a geração de diferentes tipos celulares encontrados nesta estrutura, estas células apresentam um elevado potencial terapêutico, devido a sua localização superficial na parede cortical, o que facilitaria enormemente a manipulação.

Dados preliminares do nosso laboratório indicam que uma fração de células da camada 1 pós-natal e adulta mantém capacidade proliferativa, representando uma potencial fonte de células utilizáveis em terapias regenerativas do SNC.

## **VI. Referências Bibliográficas:**

Altman J (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433–57

Alves JA, Barone P, Engelender S, Froes MM, Menezes JRL (2002) Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J Neurobiol* 52(3):251-265

Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL (1999) Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of *Dlx* genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb Cortex* 9:646-654.

Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.

Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.

Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK (2002) Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in situ. *Cereb Cortex* 12:702-709.

Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK (2002) Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in situ. *Cereb Cortex* 12:702-709.

Ang ES, Jr., Haydar TF, Gluncic V, Rakic P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23:5805-5815.

Angevine JJ & Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768

Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890.

Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Dai XF, Simmons JA (1991) Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* 307:499-516.

Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.

Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8:1002-1012.

Bishop KM, Garel S, Nakagawa Y, Rubenstein JL, O'Leary DD (2003) Emx1 and Emx2 cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. *J Comp Neurol* 457:345-360.

Bottenstein J, Hayashi I, Hutchings S, Masui H, Mather J, McClure DB, Ohasa S, Rizzino A, Sato G, Serrero G, Wolfe R, Wu R (1979) The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol* 58:94-109.

Boulder Committee (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat Rec* 166:257-262

Brittis PA, Meiri K, Dent E. & Silve J. (1995) The earliest pattern of neuronal differentiation and migration in the mammalian central nervous system. *Exp. Neurol.* 133, 1-12.

Brustle O, Maskos U, McKay RD (1995) Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. *Neuron* 15:1275-1285.

Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.

Campbell K, Olsson M, Bjorklund A (1995) Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15:1259-1273.

Carletti B, Grimaldi P, Magrassi L, Rossi F (2004) Engraftment and differentiation of neocortical progenitor cells transplanted to the embryonic brain in utero. *J Neurocytol* 33:309-319.

Casarosa S, Fode C, Guillemot F (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126:525-534.

Caviness VS Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res.* 256:293–302.

Cepko C, Ryder EF, Austin CP, Walsh C, Fekete DM (1995) Lineage analysis using retrovirus vectors. *Methods Enzymol* 254:387-419.

Cepko CL, Ryder EF, Austin CP, Walsh C, Fekete DM (1993) Lineage analysis using retrovirus vectors. *Methods Enzymol* 225:933-960.

Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH. (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18, 29–42.

Chapouton P, Gartner A, Gotz M (1999) The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development* 126:5569-5579.

Chapouton P, Schuurmans C, Guillemot F, Gotz M (2001) The transcription factor neurogenin 2 restricts cell migration from the cortex to the striatum. *Development* 128:5149-5159.

Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL (2005) Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* 8:1059-1068.

Corbin JG, Rutlin M, Gaiano N, Fishell G (2003) Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130:4895-4906.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–722.

D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci* 17:23-31.

D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471–79.

Davis AA, Temple S (1994) A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372:263-266.

deAzevedo LC, Fallet C, Moura-Neto V, Daumas-Duport C, Hedin-Pereira C, Lent R (2003) Cortical radial glial cells in human fetuses: Depth correlated transformation into astrocytes. *J Neurobiol* 11:288-298

De Carlos JA, O'Leary DD (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci* 12:1194-1211.



De Carlos JA, López-Mascaraque L & Valverde F. (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.* 16, 6146-6156.

Del Rio JÁ, Soriano E & Ferrer I. (1992) Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *J. Comp. Biol.* 326, 501-526.

deMoraes E (2003) Proliferação, migração e diferenciação de células da zona marginal. Dissertação de Mestrado, PCM, UFRJ.

Desai AR, McConnell SK (2000) Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* 127:2863-2872.

Dinopoulos A, Dori I, Parnavelas JG (1993) Serotonergic innervation of the mature and developing lateral septum of the rat: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 55:209-222.

Doetsch F, varez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.

Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, et al.. (2000). Reelin binds  $\alpha3\beta1$  integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27, 33–44.

Edmonson JC & Hatten ME (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.* 7, 1928-1934.

Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF (2005) Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25:247-251.

Estivill-Torres G, Pearson H, van H, V, Price DJ, Rashbass P (2002) Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129:455-466.

Fishell G, Mason CA, Hatten ME (1993) Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature* 362:636-638.

Fishell G (1995) Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. *Development* 121:803-812.

Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ, Guillemot F (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14:67-80.

Frantz GD, McConnell SK (1996) Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* 17:55-61.

Gaiano N, Fishell G (1998) Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system. *J Neurobiol* 36:152-161.

Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF (2006) Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci* 26:1045-1056.

Gilmore EC, Ohshima T, Goffinet AM, Kulkarni AB, Herrup K. (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J. Neurosci.* 18, 6370–77.

Gongidi V, Ring C, Moody M, Brekken R, Sage EH, Rakic P, Anton ES (2004) SPARC-like 1 regulates the terminal phase of radial glia-guided migration in the cerebral cortex. *Neuron* 41:57-69.

Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.

Grove EA, Williams BP, Li DQ, Hajihosseini M, Friedrich A, Price J (1993) Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development* 117:553-561.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 342–55.

Gupta A, Sanada K, Miyamoto, DT, Rovelstad S, Nadarajah B, Pearlman AL, Brunstrom J & Tsai L. (2003) Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glial interaction in radial migration. *Nat. Neurosci.* 6, 1284-1291.

Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Gotz M (2004) Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *MCN* 25(4):664-678

Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C, Schuurmans C, Guillemot F, Polleux F (2005) Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48:45-62.

Hartfuss E, Forster E, Bock HH, Hack MA, Leprince P, Luque JM, Herz J, Frotscher M, Gotz M (2003) Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130:4597-4609.

Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet activating factor acetylhydrolase. *Nature* 370, 216–18.

Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3196-3201.

Haubst N, Berger J, Radjendirane V, Graw J, Favor J, Saunders GF, Stoykova A, Gotz M (2004) Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development* 131:6131-6140.

Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-5774.

Haydar TF, Ang E Jr, Rakic P (2003) Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2890-2895.

Hedin-Pereira C, deMoraes EC, Santiago MF, Mendez-Otero R, Lent R (2000) Migrating neurons cross a reelin-rich territory to form an organized tissue out of embryonic cortical slices. *Eur J Neurosci* 12:4536-4540.

Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5:308-315.

Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res* 141:39-53.

Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van H, V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522-525.

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, et al.. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine

phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481–89.

Howell BW, Herrick TM, Cooper JA. (1999). Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.* 13, 643–48.

Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389, 733–37.

Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA. (2000). Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr. Biol.* 10, 877–85.

Jiménez D, López-Mascaraque LM, Valverde F & de Carlos JA. (2002) Tangential migration in neocortical development. *Dev. Biol.* 244, 155-169.

Jimenez D, Rivera R, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2003) Origin of the cortical layer I in rodents. *Dev Neurosci* 25:105-115.

Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9:173-179.

Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, et al.. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. J. Neurosci. 21, 6758–71.

Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V & Parnavelas JG. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. J. Neurosci. 99, 7881-7888.

Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature 417:645-649.

Levison SW, Goldman JE (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. Neuron 10:201-212.

Levison SW, Goldman JE (1997) Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. J Neurosci Res 48:83-94.

Lois C, varez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science 264:1145-1148.



Lois C, Garcia-Verdugo JM, varez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.

Lu QR, Park JK, Noll E, Chan JA, Alberta J, Yuk D, Alzamora MG, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH, Black PM (2001) Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10851-10856.

Luskin MB, Pearlman AL, Sanes JR (1988) Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in situ and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1:635-647.

Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.

Luskin MB, Parnavelas JG, Barfield JA (1993) Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 13:1730-1750.

Luque JM, Morante-Oria J & Fairén A (2003) Localization of ApoER2, VLDRL and Dab-1 in radial glia: groundwork for a new model of reelin action during cortical development. *Dev. Brain Res.* 140, 195-203.

Magdaleno S, Keshvara L, Curran T. (2002). Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. *Neuron* 33, 573–86.

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.

Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.

Mallamaci A, Muzio L, Chan CH, Parnavelas J, Boncinelli E (2000) Area identity shifts in the early cerebral cortex of *Emx2*<sup>-/-</sup> mutant mice. *Nat Neurosci* 3:679-686.

Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21:64-71.

Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.

Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.

Marshall CA, Goldman JE (2002) Subpallial *dlx2*-expressing cells give rise to astrocytes and oligodendrocytes in the cerebral cortex and white matter. *J Neurosci* 22:9821-9830.

Marshall CA, Suzuki SO, Goldman JE (2003) Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia* 43:52-61.

Marshall CA, Novitsch BG, Goldman JE (2005) *Olig2* directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci* 25:7289-7298.

McCarthy M, Turnbull DH, Walsh CA, Fishell G (2001) Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci* 21:6772-6781.

McConnell SK (1989) The determination of neuronal fate in the cerebral cortex. *Trends Neurosci* 12:342-349.

McConnell SK, Kaznowski CE (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254:282-285.

Meyer G, Soria JM, Martinez-Galan JR, Martin-Clemente B, Fairen A (1998) Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* 397:493-518.

Meyer G, Wahle P (1999) The paleocortical ventricle is the origin of reelin-expressing neurons in the marginal zone of the foetal human neocortex. *Eur J Neurosci* 11:3937-3944.

Mione MC, Danevic C, Boardman P, Harris B, Parnavelas JG (1994) Lineage analysis reveals neurotransmitter (GABA or glutamate) but not calcium-binding protein homogeneity in clonally related cortical neurons. *J Neurosci* 14:107-123.

Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17:2018-2029.

Miyama S, Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1997) A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. *Cereb Cortex* 7:678-689.

Miyoshi G, Butt SJB, Takebayashi H, Fishell G (2005) Olig2+ progenitors give rise to specific populations of cortical interneurons and oligodendrocytes in a temporally regulated manner. SFN abstract

Morrow T, Song MR, Ghosh A (2001) Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128:3585-3594.

Murase S, Horwitz AF (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.* 22, 3568–79.

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL. & Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 143-150.

Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 5:218-224.

Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5:1279-1287.

Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161-3173.

Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-144.

O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258:299-302.

O'Rourke NA, Chenn A & McConnell SK. (1997) Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development* 124, 997-1005.

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14:899-912.

Olsson M, Bjerregaard K, Winkler C, Gates M, Bjorklund A, Campbell K (1998) Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat embryonic forebrain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties. *Eur J Neurosci* 10:71-85.

Panchision DM, McKay RD (2002) The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 12(4):678-687

Parnavelas JG, Barfield JA, Franke E, Luskin MB (1991) Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cereb Cortex* 1:463-468.

Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23:126-131.

Price J, Thurlow L (1988) Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 104:473-482.

Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S (1997) FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18:81-93.

Qian X, Goderie SK, Shen Q, Stern JH, Temple S (1998) Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development* 125:3143-3152.

Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S (2000) Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28:69-80.

Rakic P (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33:471-476.

Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol* 141:283-312.

Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61-83.



Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* 18:383-388.

Rakic P (2003) Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 13:541-549.

Reid CB, Liang I, Walsh C (1995) Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron* 15:299-310.

Reid CB, Walsh CA (2002) Evidence of common progenitors and patterns of dispersion in rat striatum and cerebral cortex. *J Neurosci* 22:4002-4014.

Rice DS, Sheldon M, D'Arcangelo G, Nakajima K, Goldowitz D & Curran T. (1998) Disabled-1 acts downstream of reelin in a signaling pathway that controls organization in the mammalian brain. *Development* 125, 3719-3729.

Sauer FC. (1935) Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62, 377– 405.

Schlaggar BL, O'Leary DD (1991) Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. *Science* 252:1556-1560.

Schmechel DE, Rakic P (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* 156:115-152.

Shoukimas GM & Hinds JW. (1978) The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. *J. Comp. Neurol.* 179, 795-830.

Schuurmans C, Guillemot F (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12:26-34.

Schuurmans C, Armant O, Nieto M, Stenman JM, Britz O, Klenin N, Brown C, Langevin LM, Seibt J, Tang H, Cunningham JM, Dyck R, Walsh C, Campbell K, Polleux F, Guillemot F (2004) Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 23:2892-2902.

Schmid RS, Shelton S, Stanco A, Yokota Y, Kreidberg JA, Anton ES (2004)  $\alpha 3 \beta 1$  integrin modulates neuronal migration and placement during early stages of cerebral cortical development. *Development* 131(24):6023-6031

Schmid RS, Jo R, Shelton S, Kreidberg JA, Anton ES (2005) Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb Cortex* 15(10):1632-1636

Smart IH (1973) Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat* 116:67-91.

Smart IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H (2002) Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12:37-53.

Spassky N, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-LeSaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL, Zalc B (2001) Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFRalpha signaling. *Development* 128:4993-5004.

Stoykova A, Hatano O, Gruss P, Gotz M (2003) Increase in reelin-positive cells in the marginal zone of Pax6 mutant mouse cortex. *Cereb Cortex* 13:560-571.

Super H, Del Rio JA, Martinez A, Perez-Sust P, Soriano E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex* 10, 602–13.

Sur M, Garraghty PE, Roe AW (1988) Experimentally induced visual projections into auditory thalamus and cortex. *Science* 242:1437-1441.

Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1993) Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J Neurosci* 13:820-833.

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1995) Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15:6058-6068.

Takahashi T, Goto T, Miyama S, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1999) Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* 19:10357-10371.

Takigushi-Hayashi K, Sekigushi M, Ashigaki S, Takamatsu M, Hasegawa H, Suguki-Migishima R, Yokoyama M, Nakanishi S, Tanabe Y (2004) Generation of Reelin-positive marginal cells from the caudomedial wall of the telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24(9):2286-2295

Tamamaki N (2002) Radial glias and radial fibers: what is the function of radial fibers? *Anat Sci Int* 77(1):2-11

Tan SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PP, Reese BE, Faulkner-Jones B. (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of cerebral neocortex. *Neuron* 21, 295-304.

Tekki-Kessaris N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura S, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD (2001) Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128:2545-2554.

Temple S (1989) Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340:471-473.

Toresson H, Potter SS, Campbell K (2000) Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* 127:4361-4371.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, et al.. (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689–701.

Van Eden CG, Mrzljak L, Voom P, Uylings HP (1989) Prenatal development of GABAergic neurons in the cortex of the rat. *J Comp Neurol* 289(2):213-227

Voigt T (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* 289:74-88.

Walsh C, Cepko CL (1988) Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241:1342-1345.

Walsh C, Cepko CL (1990) Cell lineage and cell migration in the developing cerebral cortex. *Experientia* 46:940-947.

Walsh C, Cepko CL (1992) Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255:434-440.

Walsh C, Cepko CL (1993) Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* 362:632-635.

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2:461-466.

Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, varez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.

Williams BP, Price J (1995) Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14:1181-1188.

Xu Q, de la Cruz E & Anderson AS (2003) Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes? *Cerebral Cortex* 13, 670-676.

Xu Q, Cobos I, De La CE, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612-2622.

Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S (1997) Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 124:101-111.

Yoshida M, Assimacopoulos S, Jones KR, Grove EA (2006) Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* 133:537-545.

Yue T, Xian K, Hurlock E, Xin M, Kernie SG, Parada LF, Lu QR (2006) A critical role for dorsal progenitors in cortical myelination. *J Neurosci* 26(4):1275-1280

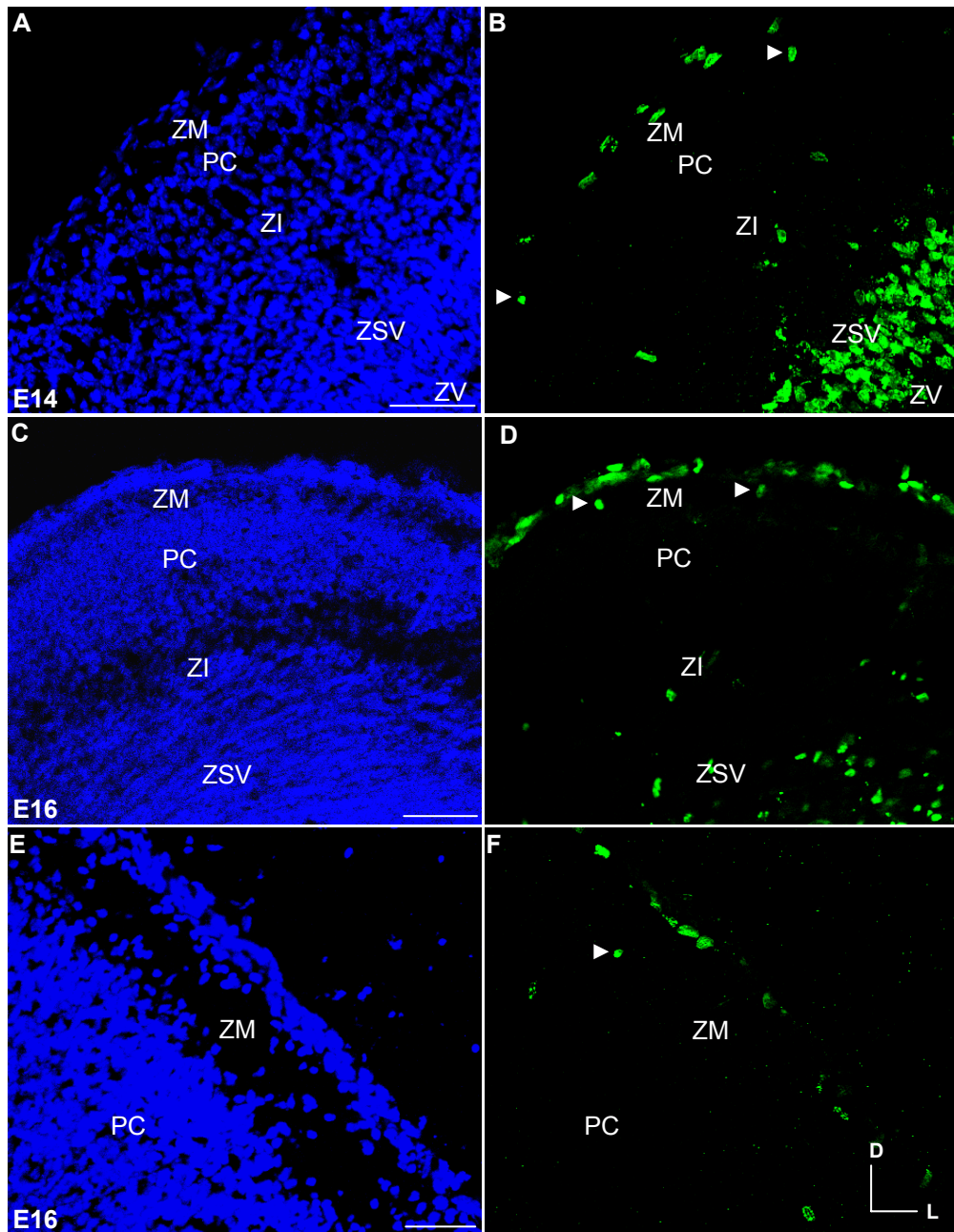
Yun K, Potter S, Rubenstein JL (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128:193-205.

Yun K, Garel S, Fischman S, Rubenstein JL (2003) Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *J Comp Neurol* 461:151-165.

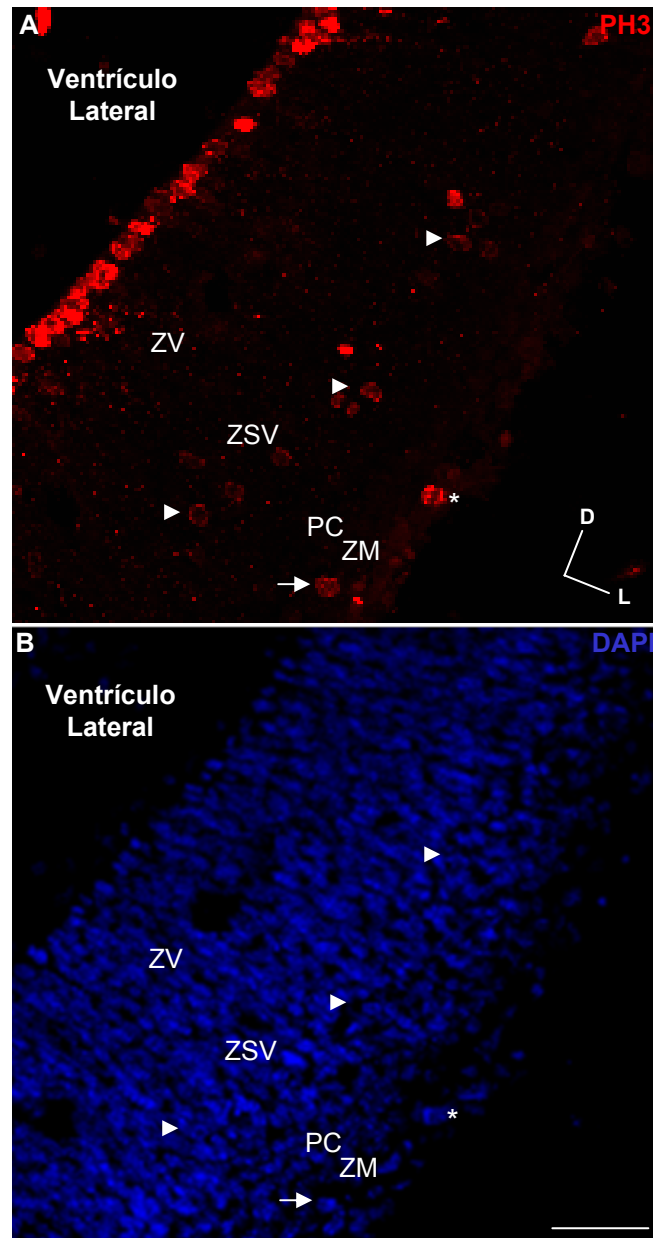
Zecevic N, Rakic P (2001) Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. *J Neurosci* 21:5607-5619.

Zecevic N, Chen Y, Filipovic R (2005) Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 491:109-122.

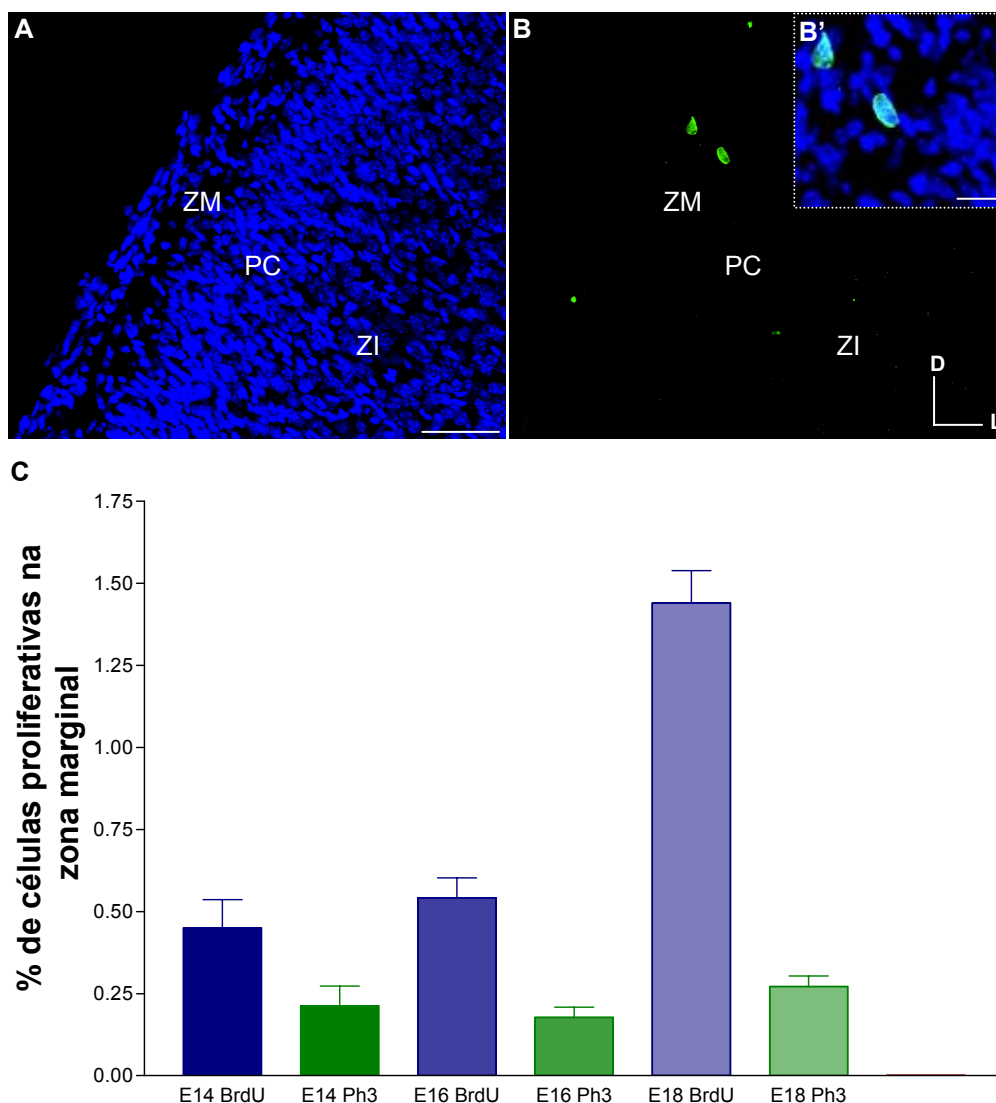




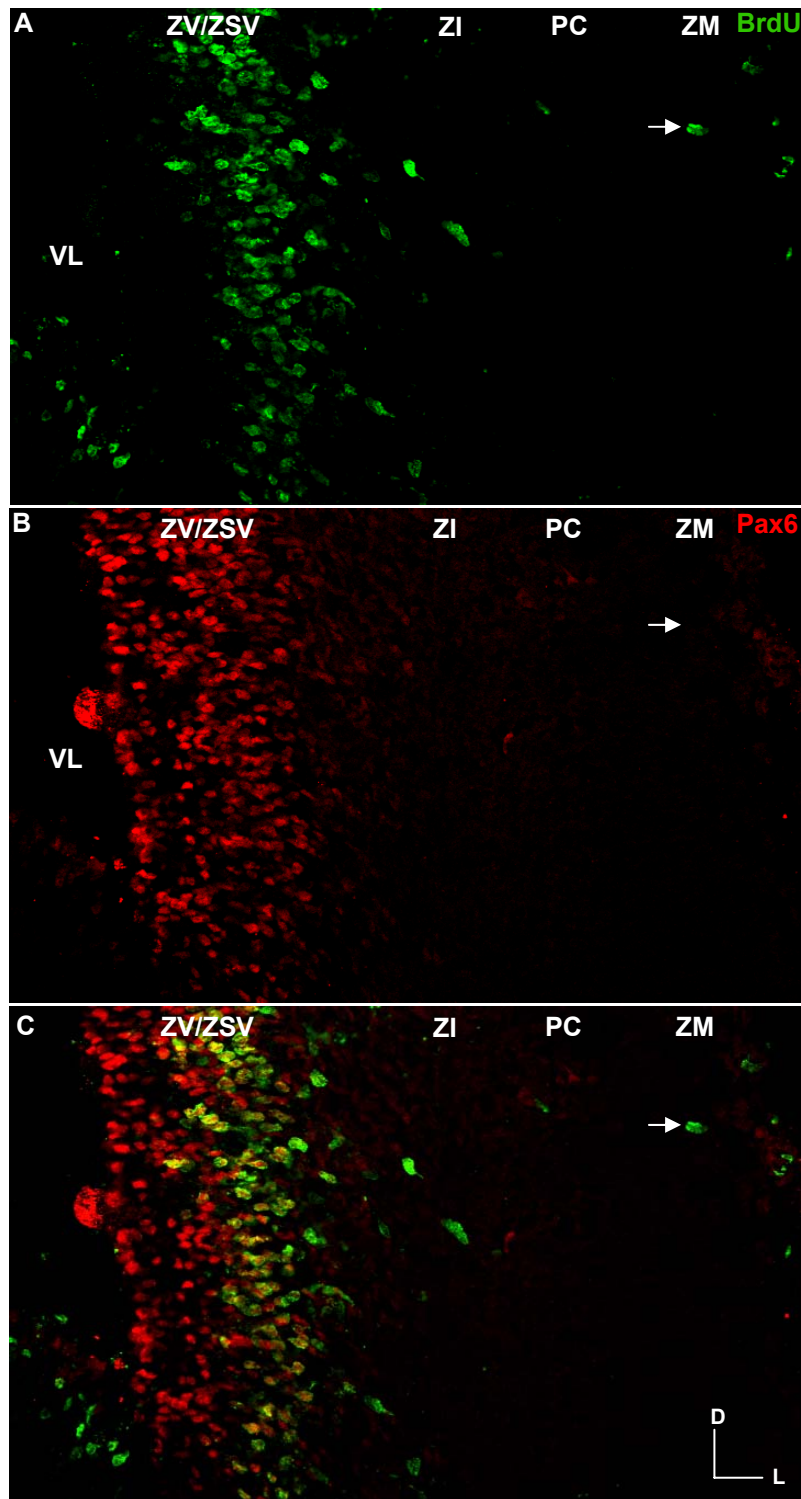
**Figura 1: Células na zona marginal proliferam *in vivo*.** Células marcadas por imunohistoquímica para BrdU na zona marginal (cabeças de seta em B, D e F) indicam a presença de progenitores nesta região em E14 (A e B), E16 (C e D) e E18 (E e F). Note a localização das células BrdU positivas na porção basal da ZV e ZSV em E14 e a ausência destas células na placa cortical. Barra de calibração em A, C e E: 50µm. ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZI: zona intermediária; ZSV: zona subventricular; ZV: zona ventricular; D: dorsal; L: lateral.



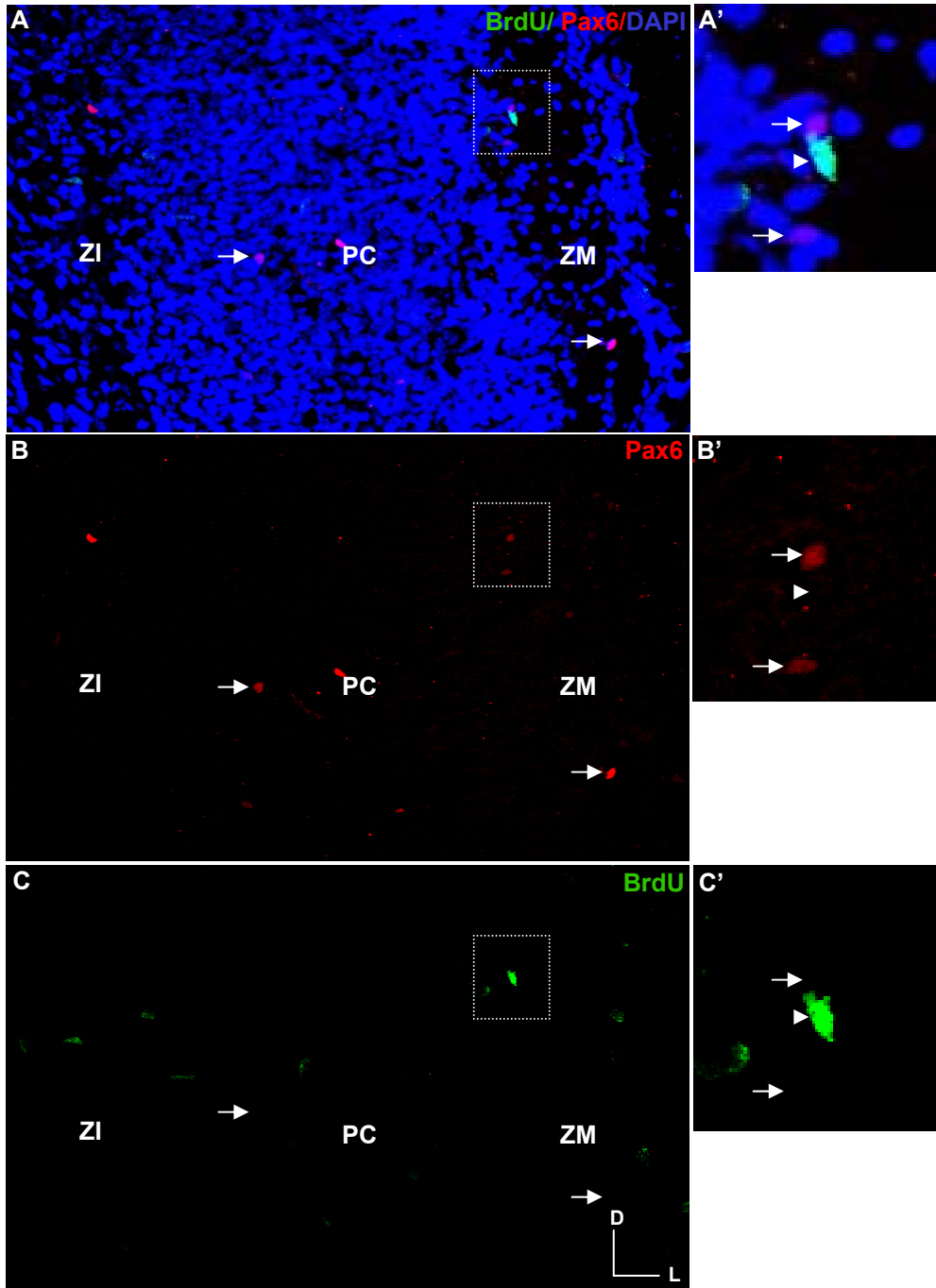
**Figura 2: Divisões celulares na zona marginal.** Imunorreatividade para a forma fosforilada da histona 3 (PH3) revela a ocorrência de mitoses na zona marginal em E14 (seta). Os progenitores na zona ventricular dividem-se ao redor do ventrículo como detectado pela imunoreatividade para PH3, enquanto uma população proliferativa secundária imunomarcada para PH3 aparece na zona subventricular (cabeças de seta). Divisões celulares muito próximas da superfície pial (asterisco) não foram classificadas como de progenitores na zona marginal. Barra de calibração: 50µm. ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZSV: zona subventricular; ZV: zona ventricular; D: dorsal; L: lateral.



**Figura 3: Proliferação na zona marginal mantém-se durante toda a corticogênese.** (A-B') Embora a atividade mitótica permaneça na zona marginal em E18 (B e B'), a relação entre o número de células BrdU+ e PH3+ triplica. (C) Percentual de células proliferativas na zona marginal em função do número total de células nesta camada. Note o aumento na proporção de células BrdU positivas em E18 quando comparada com E16 e E14. Barras de calibração: 50µm (A); 12,5µm (B'). ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZI: zona intermediária; D: dorsal; L: lateral.

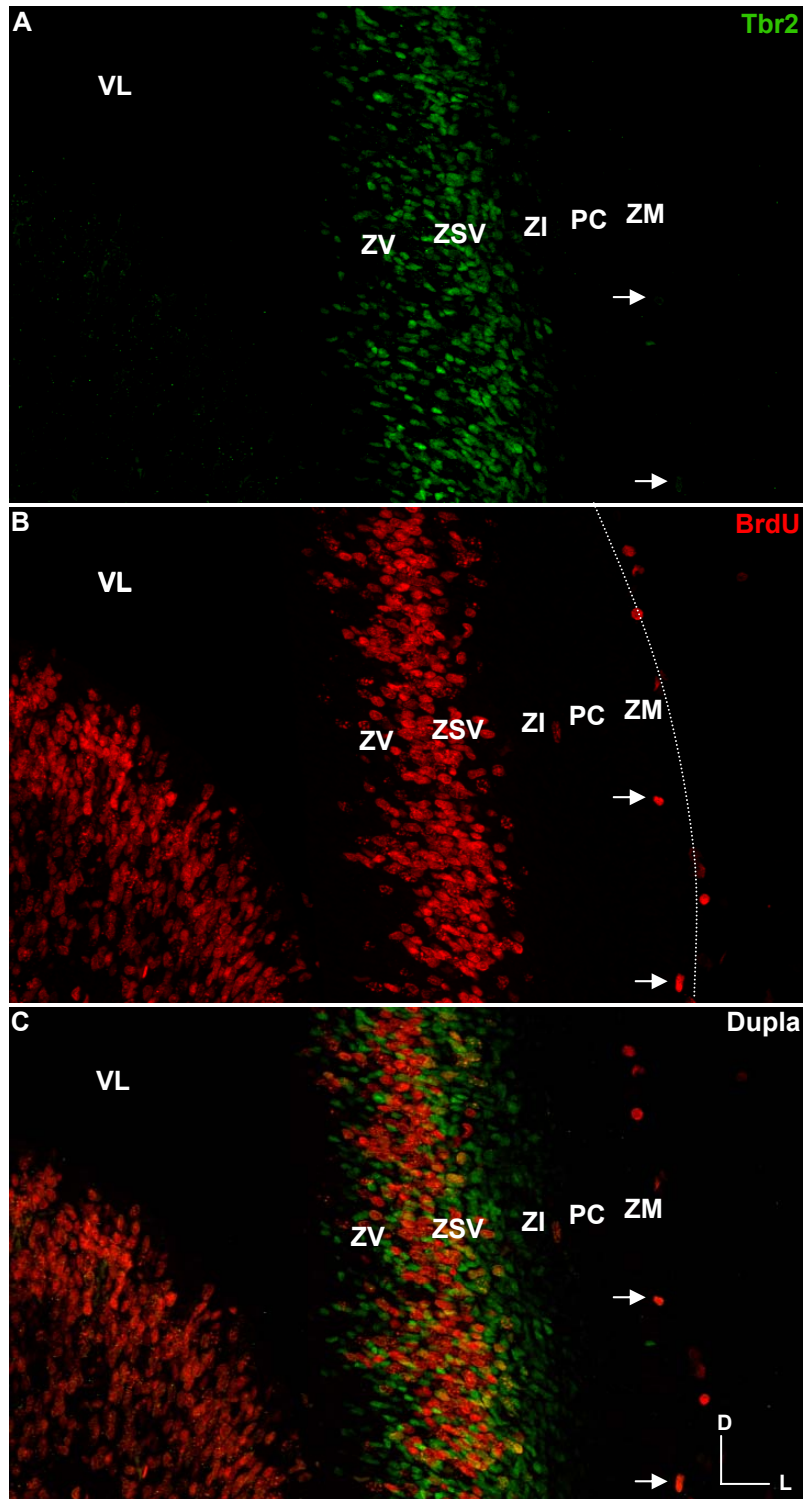


**Figura 4: Progenitores na zona marginal não expressam Pax6.** Imagens de cérebros E14 cortados coronalmente com imunohistoquímica para BrdU (A) e Pax6 (B). Apenas a região basal da ZV é marcada por BrdU (A) ao passo que toda a espessura da ZV é marcada com Pax6 (B). Note o alto índice de colocação de BrdU com Pax6 na porção basal da zona ventricular (C), enquanto as células progenitoras na zona marginal não expressam este fator (setas). Barra de calibração: 50µm. ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZI: zona intermediária; ZSV: zona subventricular; ZV: zona ventricular; D: dorsal; L: lateral.

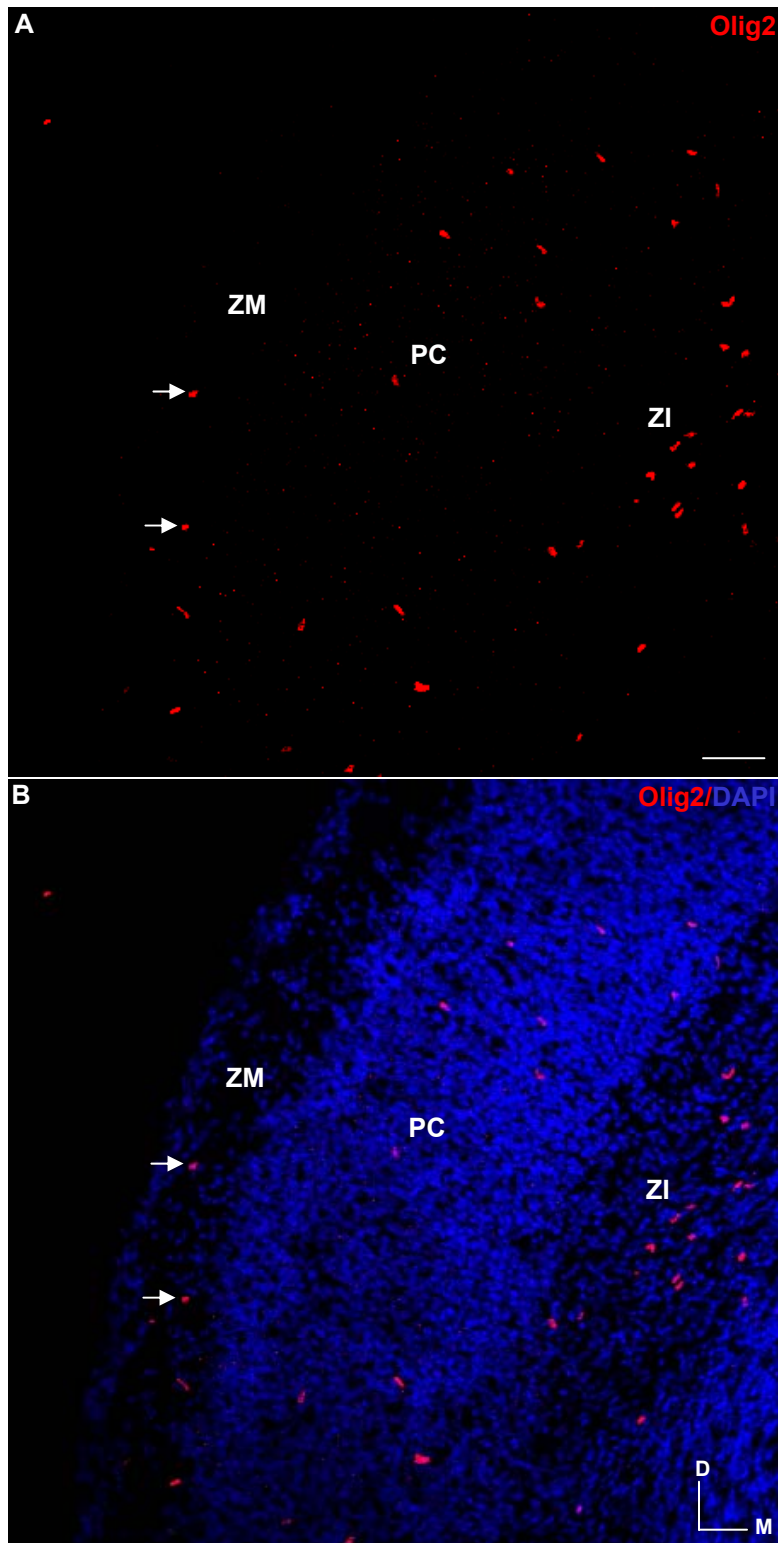


**Figura 5: Células Pax-positivas na zona marginal não incorporam BrdU.** Imagens de cortes coronais obtidos em E16, em que podemos observar células Pax6-positivas na zona marginal e placa cortical (A e B, setas). Células BrdU-positivas (A' e C', cabeças de seta) não expressam Pax6. As caixas representadas em A, B e C estão ampliadas em A', B' e C', respectivamente. Barra de calibração: . ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZI: zona intermediária; D: dorsal; L: lateral.

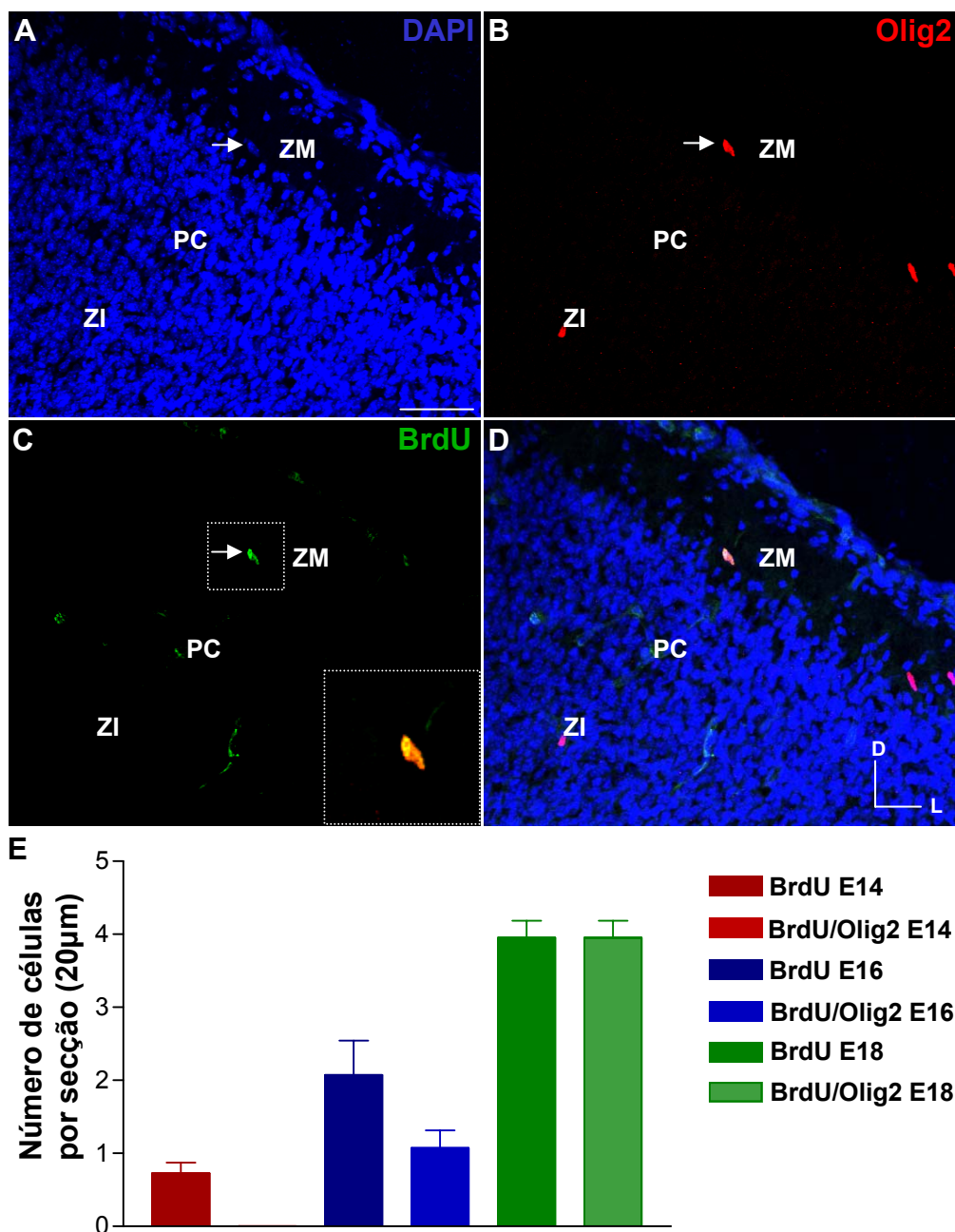




**Figura 6: Células progenitoras na zona marginal não expressam Tbr2.** Imunohistoquímica para Tbr2 (A) e BrDU (B mesmo campo) no córtex lateral de camundongos E14. Observe o grande número de células BrdU positivas/Tbr2 positivas na zona subventricular (ZSV) em contraste com a ausência de células Tbr2 positivas e o pequeno número de células BrDU positivas marcadas na zona marginal (setas). Barra de calibração: 50µm. ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZI: zona intermediária; ZSV: zona subventricular; ZV: zona ventricular; D: dorsal; L: lateral.

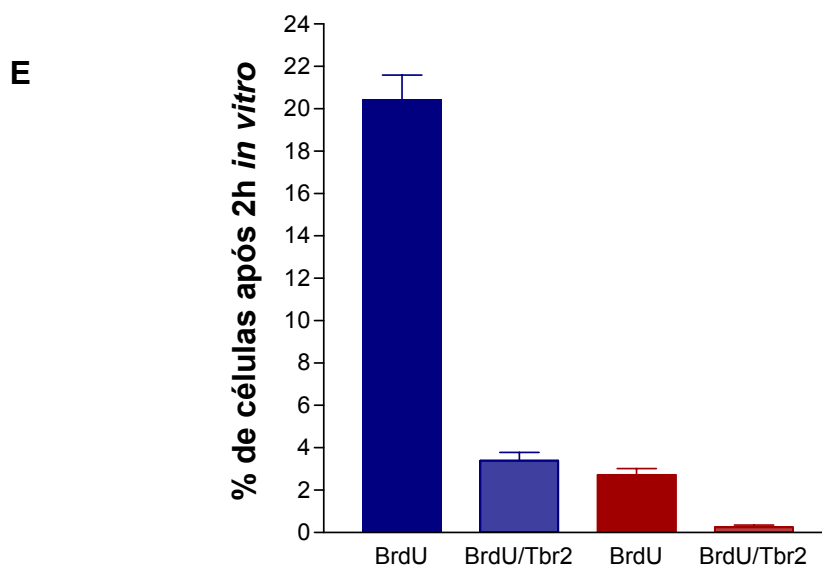
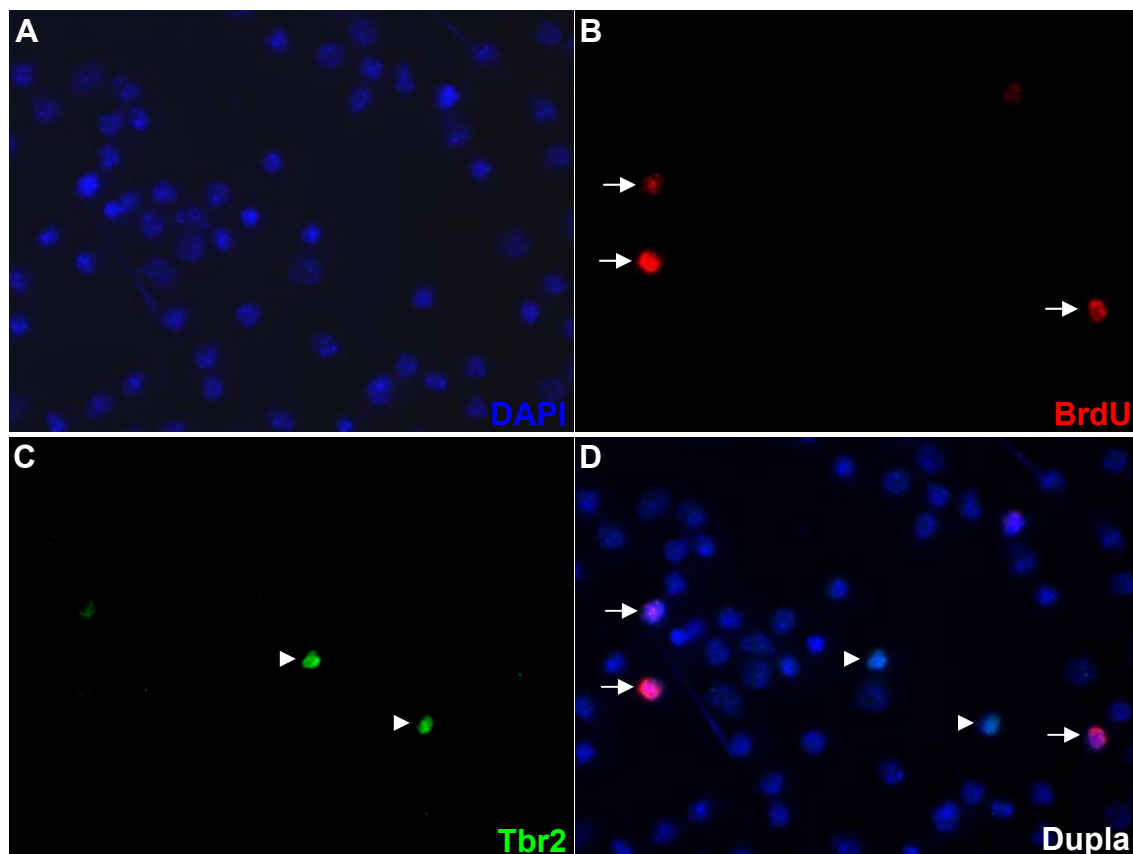


**Figura 7: Expressão de Olig2 no telencéfalo dorsal em E16.** Imunohistoquímica para Olig2 no córtex cerebral (A) acrescida da marcação nuclear para DAPI (B). Células Olig2-positivas são encontradas na porção lateral do telencéfalo dorsal em E16, distribuídas na zona intermediária (ZI), placa cortical (PC) e zona marginal (ZM, setas). Barra de calibração: 50µm

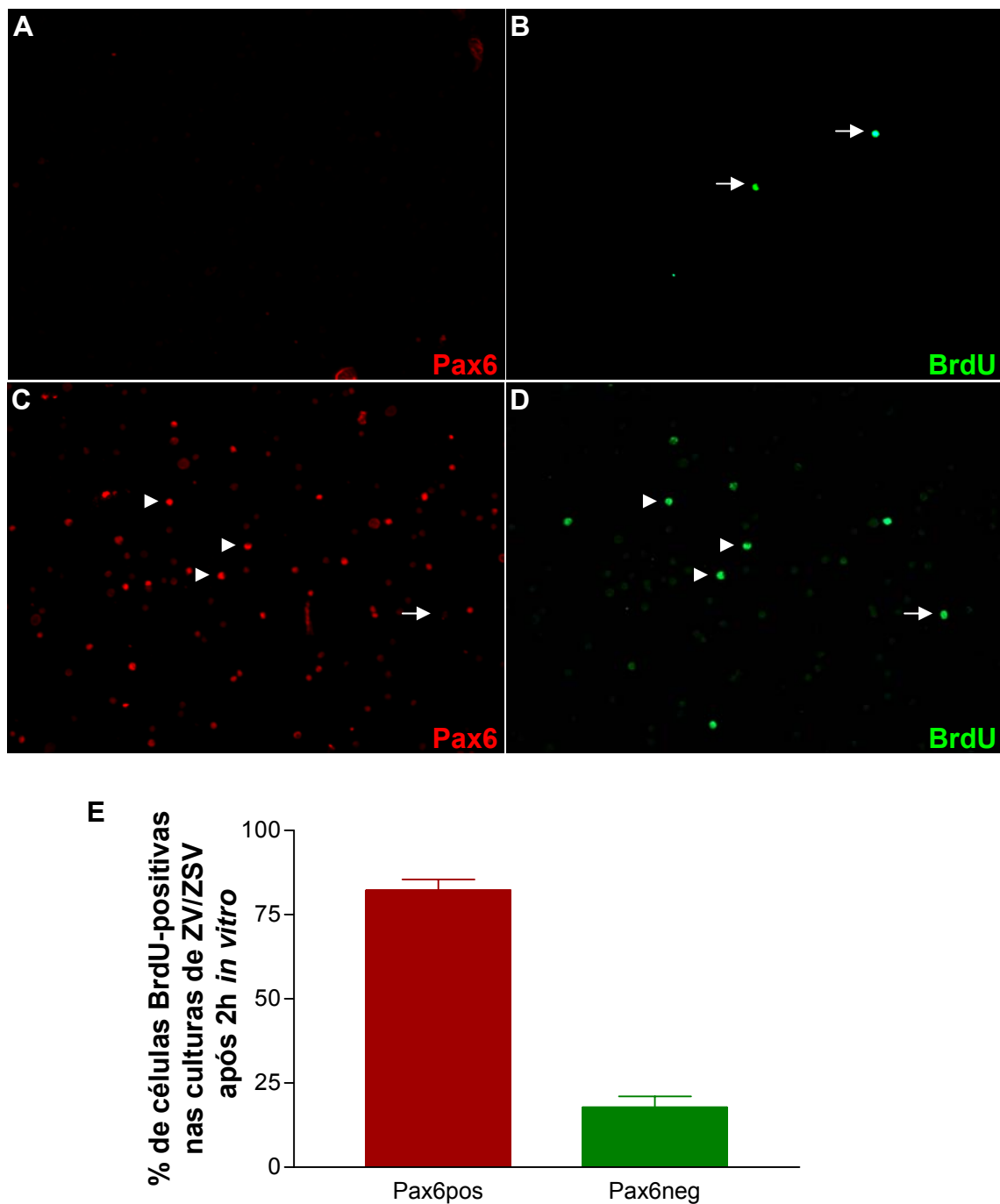


**Figura 8: Expressão de Olig2 pelos progenitores da zona marginal.** Imunohistoquímica para Olig2 e BrdU no córtex dorsal em E16. Como podemos observar na figura B, células Olig2 positivas estão presentes na parte mais lateral do telencéfalo dorsal (A apresenta o mesmo campo marcado com DAPI) e algumas destas células apresentam capacidade proliferativa (C). Em D, mesmo campo marcado com DAPI. A proporção de células BrdU-positivas que expressam Olig2 na zona marginal é, aproximadamente, 50% em E16 (E). Barra de calibração: 50µm. ZM: zona marginal; PC: placa cortical; ZI: zona intermediária; D: dorsal; L: lateral.

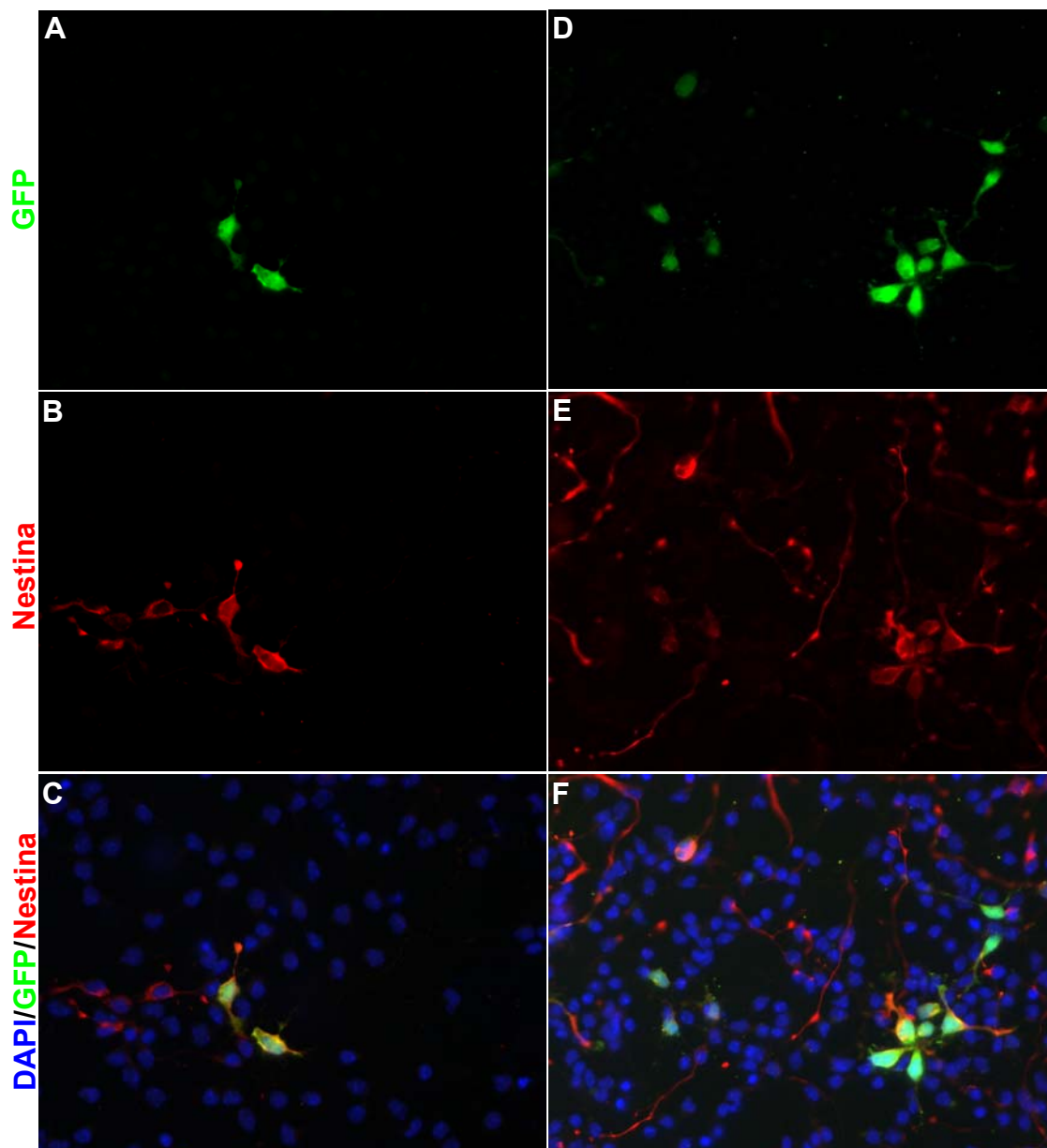




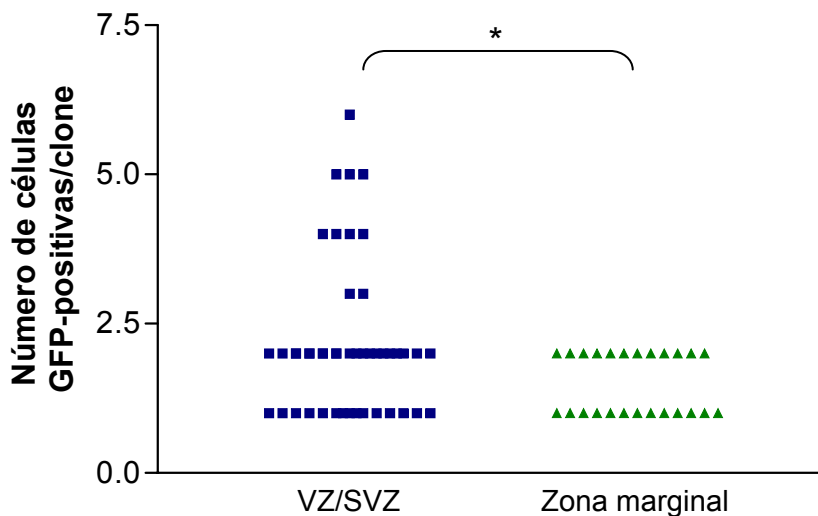
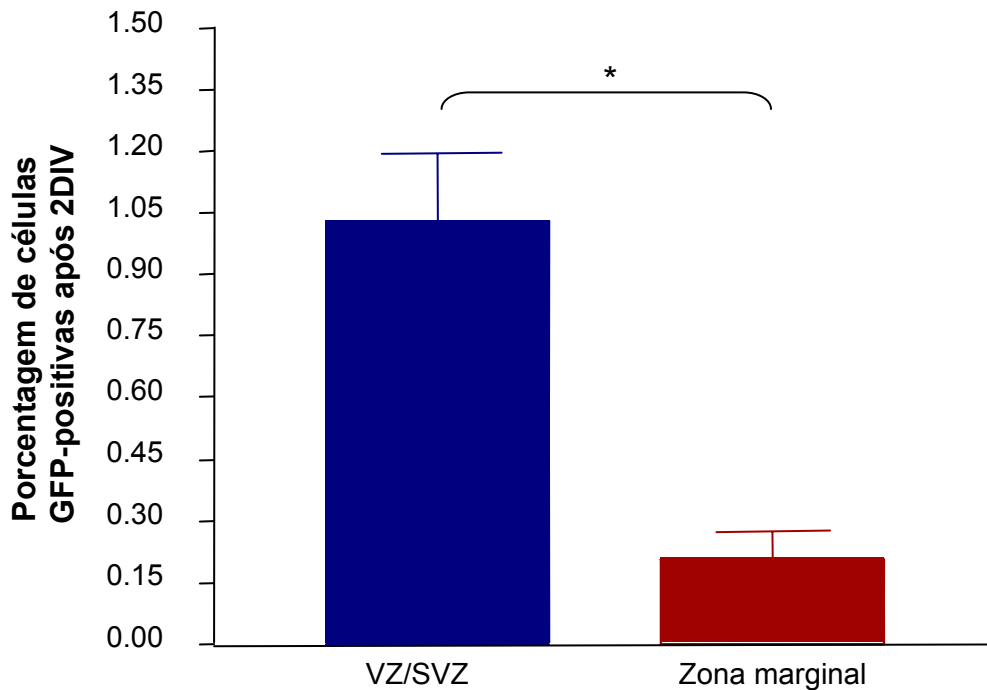
**Figura 9: Progenitores na zona marginal mantêm a capacidade proliferativa *in vitro*.** (A-D) Fotomicrografias de culturas dissociadas da metade dorsal do córtex cerebral imunoprocessadas para BrdU e Tbr2; setas apontam para células duplamente positivas e cabeças de seta indicam células positivas somente para Tbr2. (E) Proporção de células BrdU-positivas em culturas ZV/ZSV (azul) e ZM (vermelho) quantificada após 2h *in vitro*, revelando frações proliferativas menores na zona marginal. Note que menos de 10% destas células expressam Tbr2, enquanto a frequência de células BrdU-positivas/Tbr2-positivas nas culturas de ZV/ZSV é de quase 20% (E).

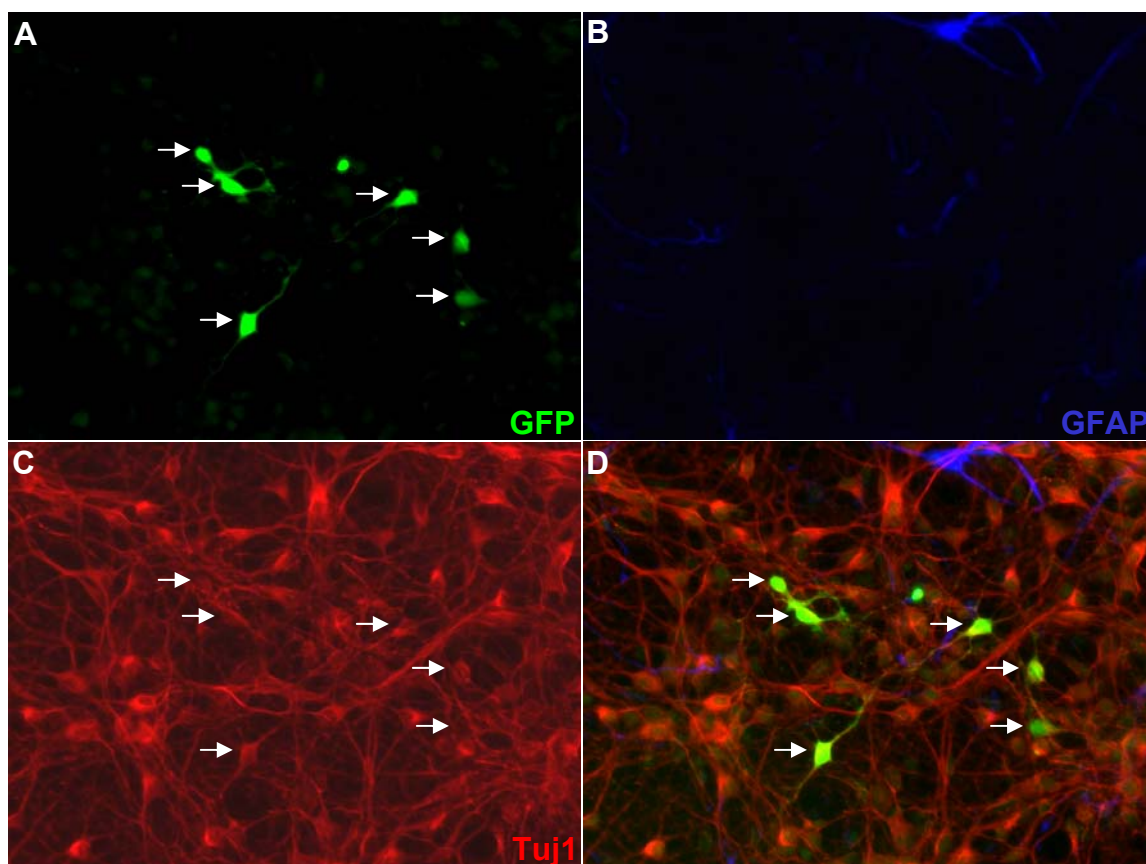


**Figura 10: Células proliferativas na zona marginal não expressam Pax6.** Imunocitoquímica para Pax6 (vermelho) e BrdU (verde) em culturas dissociadas de zona marginal (A e B) e ZV/ZSV (C e D) 2 horas após o cultivo. Note o elevado número de células BrdU-positivas/Pax6-positivas nos cultivos de ZV/ZSV (C e D, cabeças de seta), em contraste com os cultivos de zona marginal, onde não são observadas células Pax6-positivas (A). As setas em B e D indicam as células BrdU-positivas/Pax6-negativas. (E) Cerca de 80% das células proliferativas nos cultivos de ZV/ZSV expressam Pax6.

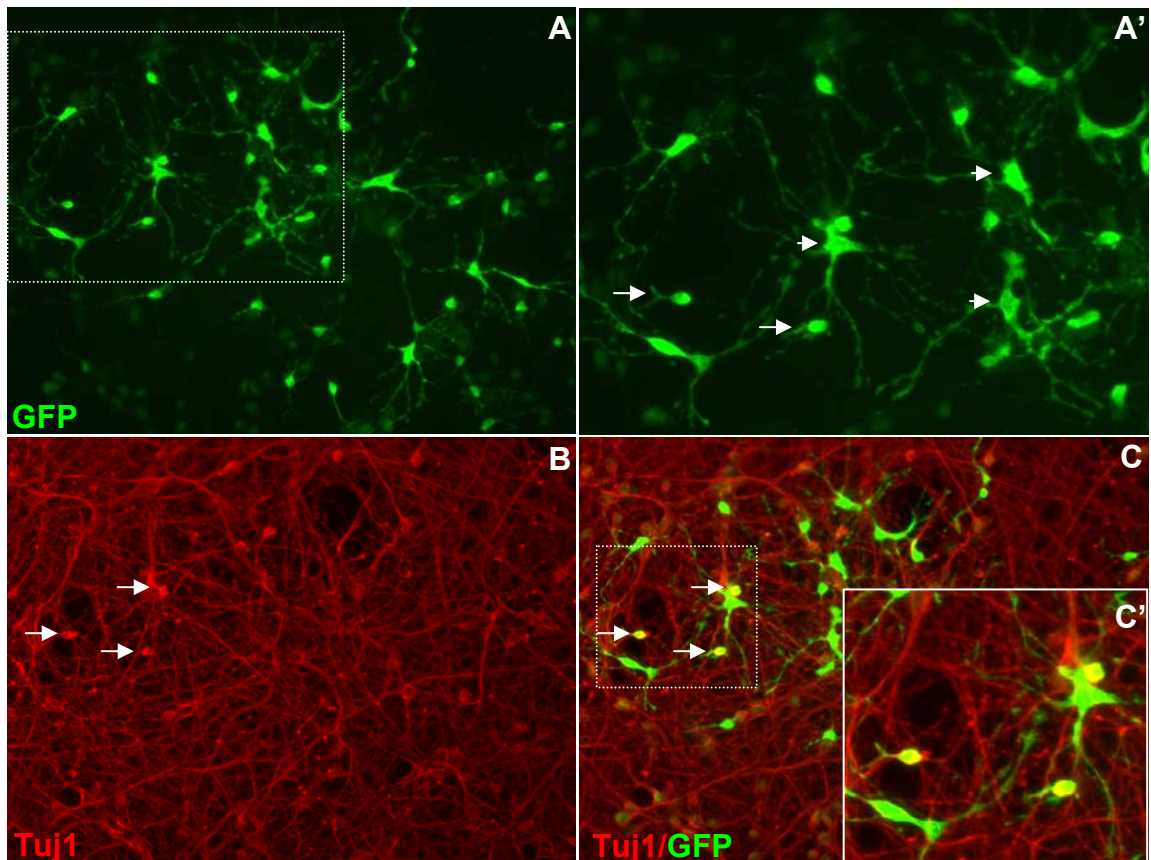


**Figura 11: Clones celulares visualizados após 2 DIV.** Cultivos de células da zona marginal (A, B e C) e VZ/ZSV (D, E e F) apresentam células com níveis detectáveis de GFP após 2 DIV. Estas células expressam nestina como revelado por imunocitoquímica (B, C, E e F) e são encontradas em pequenos grupos de 2 a 6 células. Note a presença de um maior número de células nestina-positivas nas culturas de VZ/ZSV (E), consistente com o predomínio de progenitores nestas zonas.



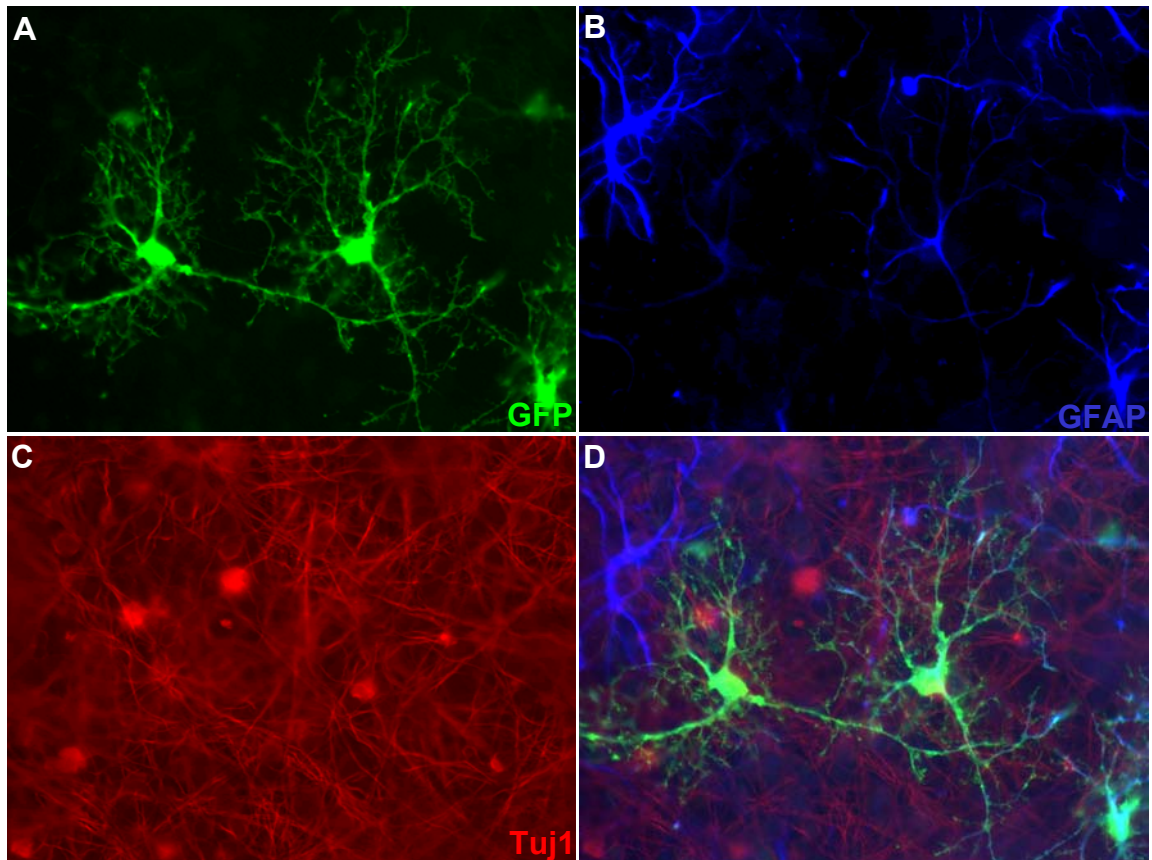


**Figura 14: Clone neuronal puro em cultura ZV/ZSV com 7 DIV.** Observe que todas as células pertencentes ao clone (setas em A) apresentam imunorreatividade para Tuj1 (setas em B e C), caracterizando seu fenótipo neuronal. Nenhuma célula GFP positiva, no entanto, apresenta imunomarcacão para GFAP (B e D).

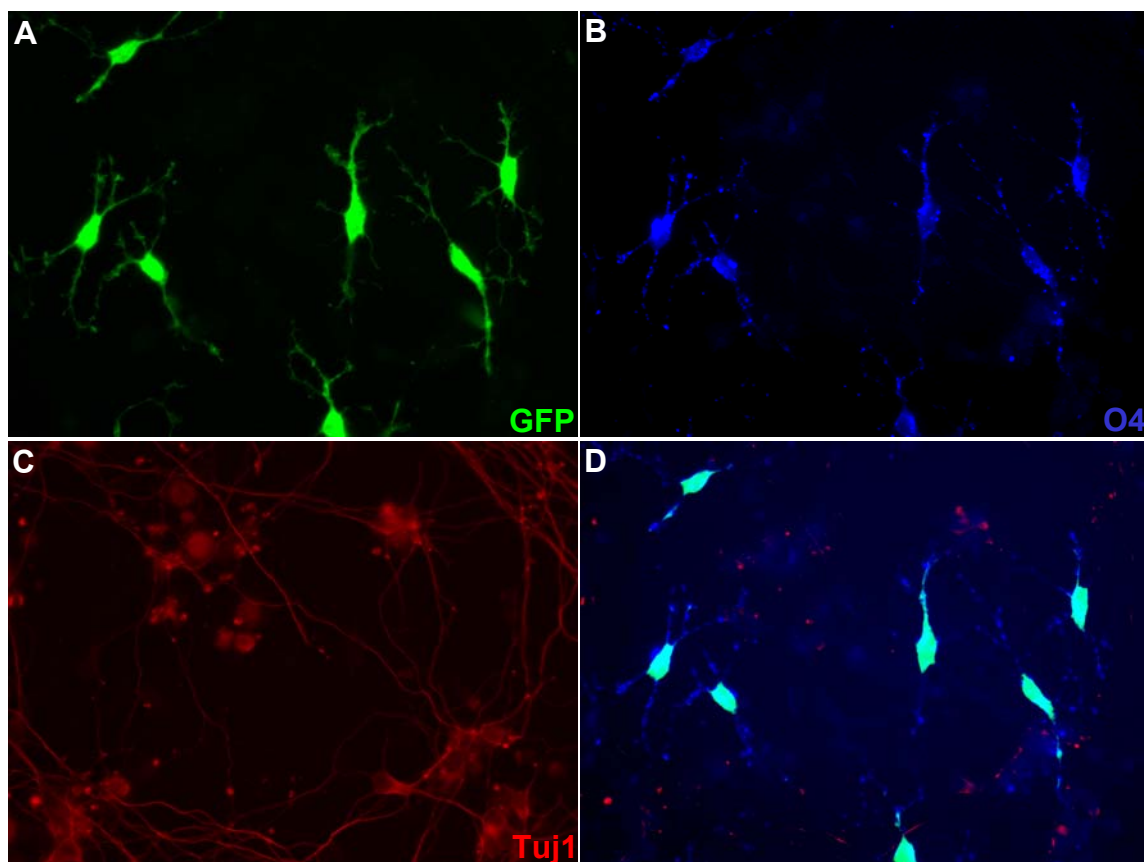


**Figura 15: Clones mistos em cultura de ZV/ZSV com 7 DIV.** Colocalização da expressão de GFP (A) e Tuj1(B) revelam a natureza neuronal de células geradas *in vitro* (B e C, setas). (A') Magnificação das células destacadas na caixa em A: observe diferentes tipos morfológicos -Tuj1positivos- (setas) e gliais (cabeças de seta). (C') Magnificação das células destacadas na caixa em C.



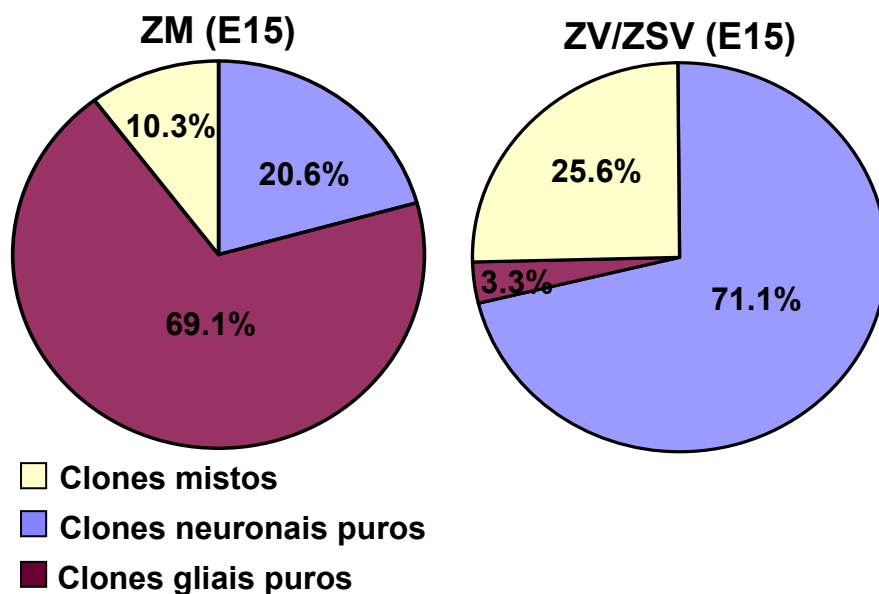


**Figura 16: Clones astrocitários puros em cultura de ZM com 7DIV.** Clone glial puro identificado por marcação com GFP (A) e imunorreatividade ao GFAP (B); note que todas as células marcadas para GFP são imunorreativas (D). Nenhuma das células GFP-positivas encontra-se marcada para Tuj1 (C).

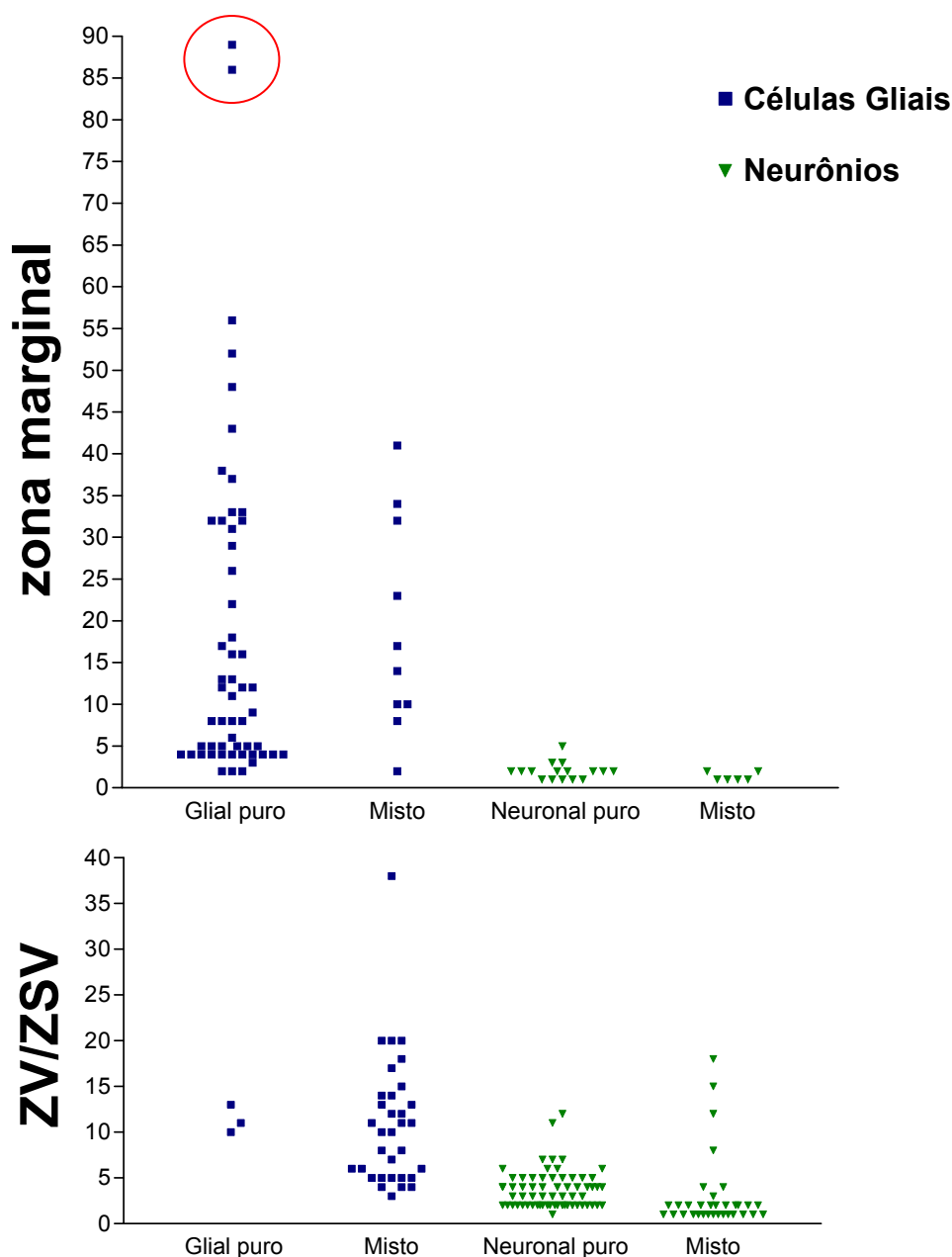


**Figura 17: Clones oligodendrocitários puros em cultura de ZM com 7DIV.** Note a morfologia bipolar das células GFP-positivas (A) e a expressão correspondente de O4 detectada por imunocitoquímica (B e D). Nenhuma célula GFP encontra-se marcada com Tuj1(C), porém são imunorreativas para O4.

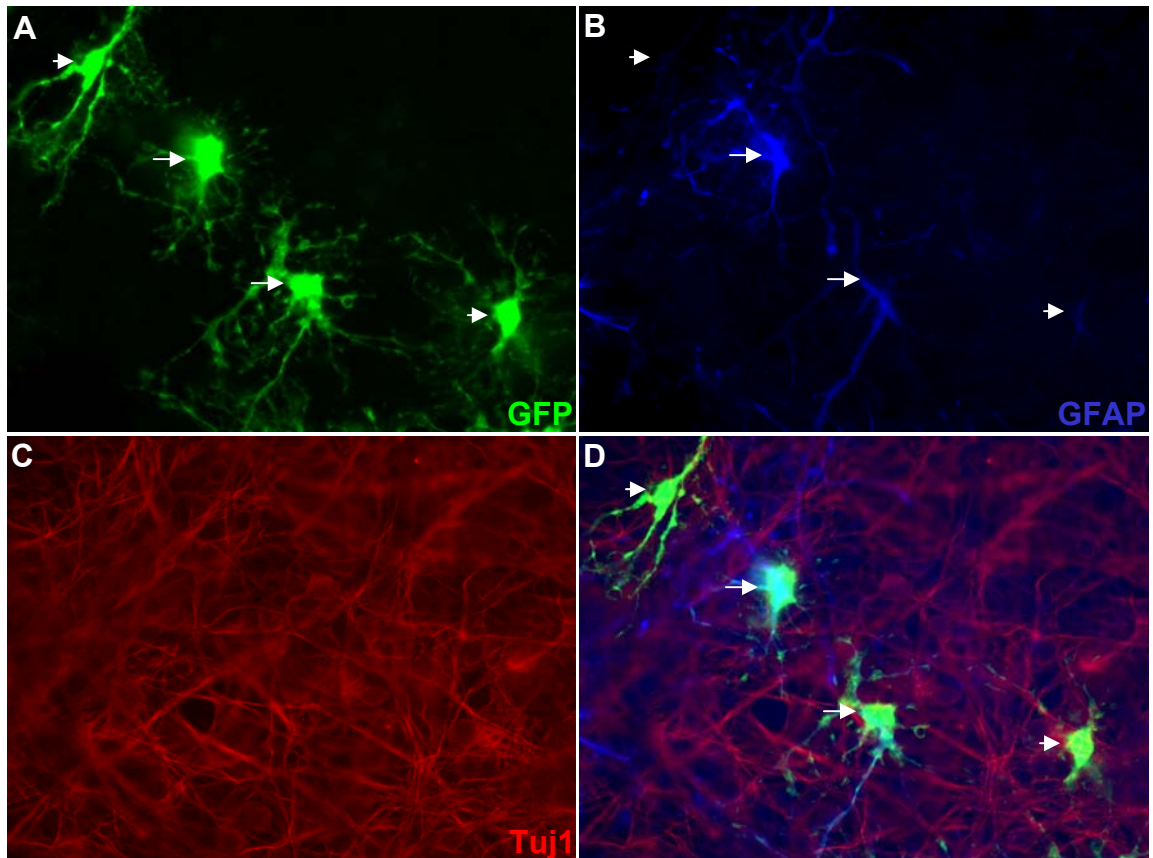




**Figura 18: Percentuais de clones neuronais puros, gliais puros e mistos em culturas de ZV/ZSV e zona marginal relativamente ao total de clones.** Enquanto mais de 70% dos clones gerados pelas células das zonas ventricular e subventricular são exclusivamente neuronais e apenas 3,3% são gliais puros, os clones gerados por progenitores da zona marginal são, majoritariamente (69,1%), gliais puros. Por outro lado, 30,9% dos clones observados em cultivos da zona marginal apresentam neurônios, sendo que 20,6% destes clones são exclusivamente neuronais. Nos dois casos (zona marginal ou ZV/ZSV), os clones mistos continham ou astrócitos ou oligodendrócitos associados a um pequeno número de neurônios.



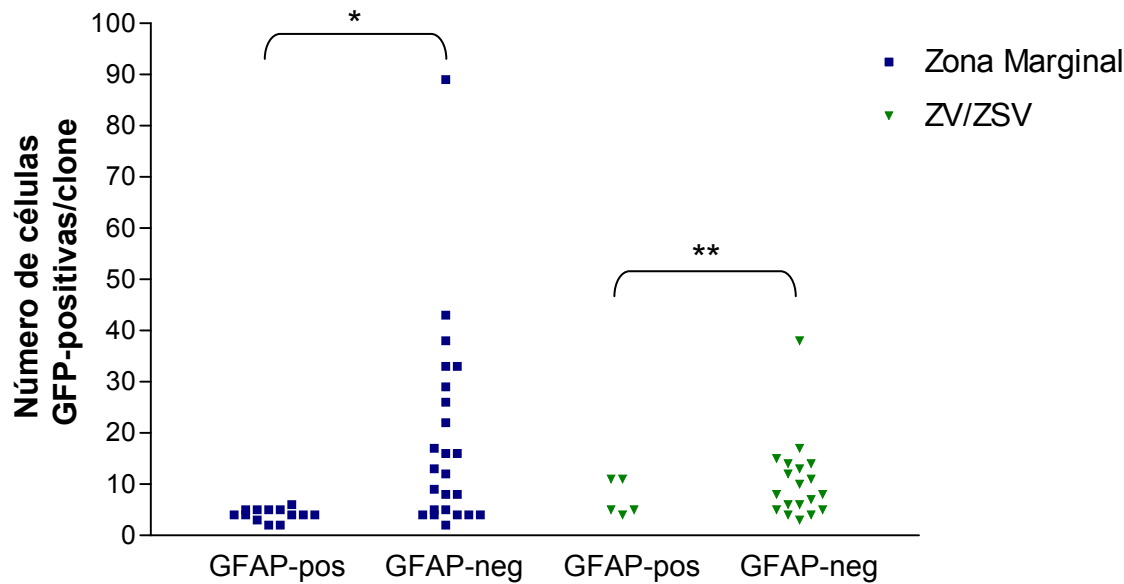
**Figura 19: Distribuição de números de neurônios e células gliais por tipo de clone nas culturas de ZM e ZV/ZSV com 7DIV.** Note que os clones neuronais puros gerados por progenitores da ZV/ZSV tendem a apresentar maior número de neurônios do que os da zona marginal. Por outro lado, apenas nas culturas de zona marginal foram encontrados clones contendo mais de 40 células gliais. Os clones mistos, em ambas as culturas, apresentaram, na maioria dos casos, 1 a 2 neurônios e números variáveis de células gliais. Por outro lado, culturas de ZV/ZSV apresentaram clones com até 20 neurônios.



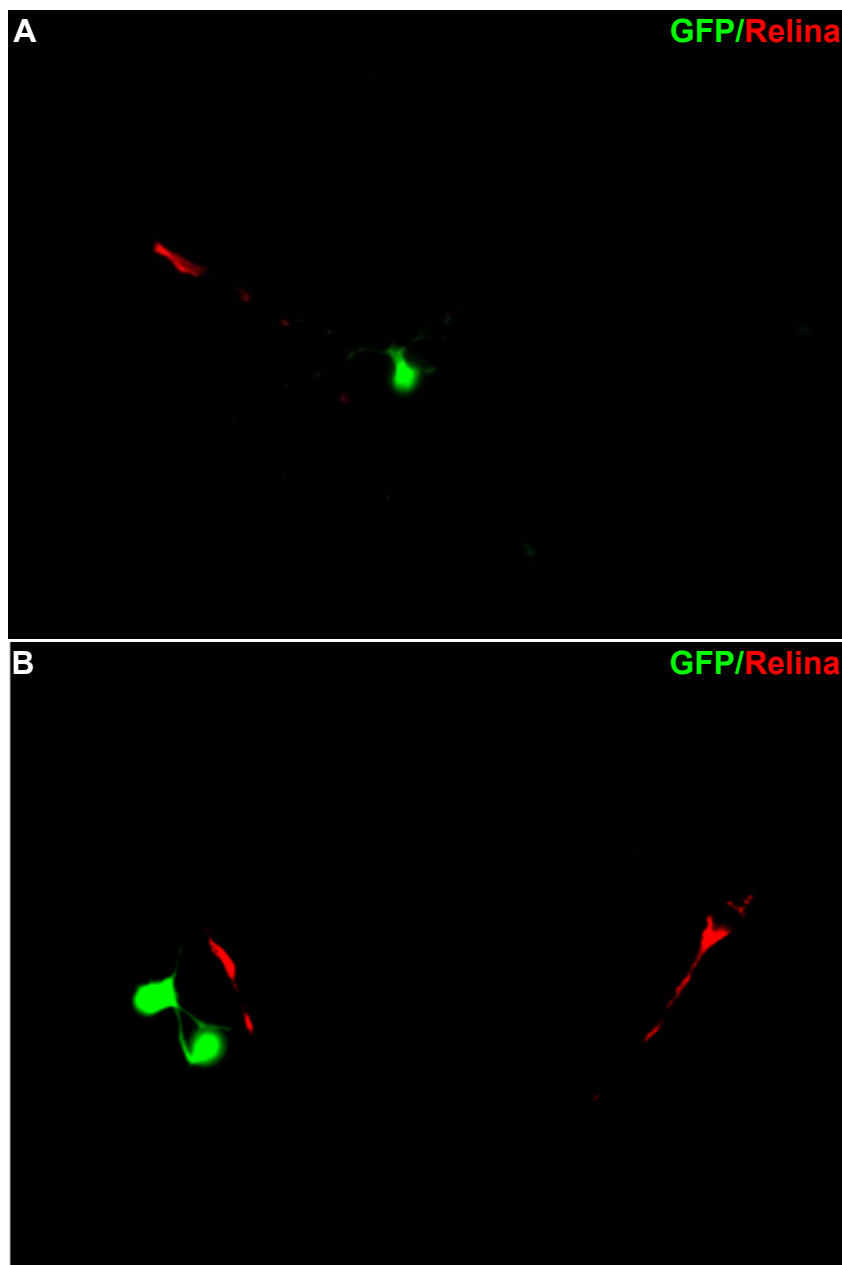
**Figura 20: Células gliais apresentam diferentes níveis de expressão de GFAP.** Clone glial puro em que duas células imunorreativas ao GFP são claramente GFAP-positivas (A, B e D, setas). As demais células, não apresentam imunorreatividade para GFAP (A, B e D, cabeças de seta), mas são morfológicamente semelhantes as demais (compare as células indicadas pelas setas e cabeças de seta em A).

Tabela I - Valores percentuais de clones astrogliogênicos relativamente aos clones totais encontrados em culturas de zona marginal.

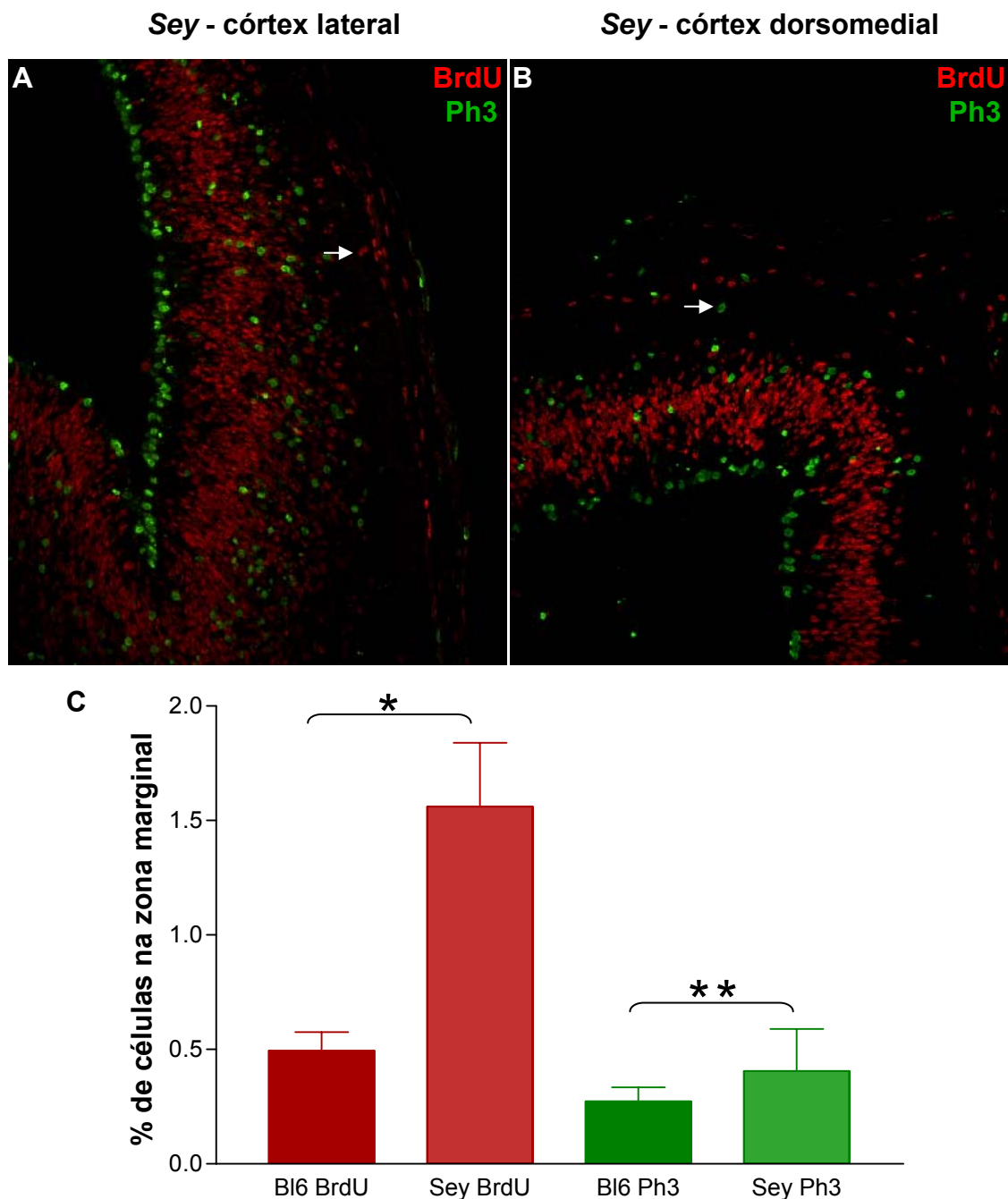
	GFAP+	GFAP-
zona marginal	35.6%	64.4%
ZV/ZSV	26.9%	73.1%



**Figura 21: Clones astrocitários apresentam baixos números de células.** Em culturas de células da zona marginal, clones mistos ou gliais puros formados exclusivamente por células Tuj1-negativas/GFAP-negativas apresentam números de células mais elevados do que aqueles formados por células Tuj1-negativas/GFAP-positivas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p > 0,05$  Turkey's Multiple Comparison Test ).



**Figura 22: Neurônios GFP-positivos em cultura de ZM e ZV/ZSV após 7 DIV e imunocitoquímica para relina.** Clones neuronais nos cultivos da zona marginal não apresentam células imunorreativas para a proteína relina (A), assim como os clones neuronais da ZV/ZSV (B).



**Figura 23: Aumento do número de células proliferativas na zona marginal de camundongos small eye (Sey).** Assim como nos camundongos C57/Bl6, a maioria das células imunorreativas para BrdU e PH3 encontram-se nas zonas ventriculares e subventriculares (A, córtex lateral e B, córtex dorsomedial), mas há uma pequena fração de células proliferativas na zona marginal (setas em A e B). A proporção de células BrdU+ na zona marginal de camundongos Sey é cerca de três vezes maior do que nos selvagens em E14 (Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ), com um discreto aumento na proporção de células PH3+ ( $p = 0.3867$ ).